

TESIS DE DOCTORADO

**VACUNACIÓN EN RODABALLO,
Scophthalmus maximus (L.):
ANÁLISIS DE LA RESPUESTA
INMUNITARIA Y DESARROLLO DE
NUEVOS ADYUVANTES**

Francisco Fontenla Iglesias

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS, TECNOLOGÍA Y GESTIÓN

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2019





DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

Vacunación en rodaballo, *Scophthalmus maximus* (L.): análisis de la respuesta inmunitaria y desarrollo de nuevos adyuvantes.

D. Francisco Fontenla Iglesias

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) *La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) *En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) *La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) *Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

En Santiago, 4 de octubre de 2019.

Fdo: Francisco Fontenla
Iglesias





AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

Vacunación en rodaballo, *Scophthalmus maximus* (L.): análisis de la
respuesta inmunitaria y desarrollo de nuevos adyuvantes

D. Jesús Lamas Fernández

D. Manuel Noia Guldrís

INFORMAN:

*Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por D. **Francisco Fontenla Iglesias**, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.*

En Santiago de Compostela., 4 de octubre de 2019

Fdo: Jesús Lamas
Fernández

Fdo: Manuel Noia
Guldrís



Los resultados expuestos en esta tesis doctoral han sido publicados o están pendientes de publicación en los siguientes artículos de investigación:

Fontenla, F., Blanco-Abad, V., Pardo, B.G., Folgueira, I., Noia, M., Gómez-Tato, A., Martínez, P., Leiro, J.M., Lamas, J. (2016). Vaccine-induced modulation of gene expression in turbot peritoneal cells. A microarray approach. *Mol. Immunol.*, 75: 188-99. doi: 10.1016/j.molimm.2016.06.001

Fontenla-Iglesias, F., Estensoro, I., Valle, A., Noia, M., Blanco-Abad, V., Sitjà-Bobadilla, A., Tafalla, C., Leiro, J.M., Lamas, J. The spleen in the humoral immune response of turbot (*Scophthalmus maximus*) to vaccination with the ciliate parasite *Philasterides dicentrarchi* (*manuscrito en preparación*).

Fontenla-Iglesias, F., Valle, A., Noia, M., Leiro, J.M., Lamas, J. Turbot *mrc1* receptors: phylogenetic analysis, functional characterization and changes in gene expression during vaccination with the parasite ciliate *Philasterides dicentrarchi* (*manuscrito en preparación*).

Fontenla-Iglesias, F., Noia, M., Valle, A., Blanco-Abad, V., Leiro, J.M., Lamas, J. The turbot neutrophil peroxidase: characterization and functional studies (*manuscrito en preparación*).

Fontenla-Iglesias, F., Leiro, J.M., Folgueira, I., Valle, A., Blanco-Abad, V., Noia, M., Lamas, J. Formulation of new adjuvants to be used in fish vaccines (*manuscrito en preparación*).



CONFLICTO DE INTERÉS

VACUNACIÓN EN RODABALLO, *Scophthalmus maximus* (L.): ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNITARIA Y DESARROLLO DE NUEVOS ADYUVANTES

D. Francisco Fontenla Iglesias

Declara no tener ningún conflicto de interés en relación a su tesis doctoral.

En Santiago de Compostela, 4 de octubre de 2019

Fdo: Francisco Fontenla Iglesias



AGRADECEMENTOS

Fun un incauto deixando para o final a parte máis difícil da tese. Penso en todos os que durante estes anos estivestes ao meu lado apoiándome e fáltanme as palabras para darvos as grazas. Quizais estes non sexan os agradecementos máis floridos, pero prométovos que os intentarei escribir con sangue.

En primeiro lugar quero expresar a miña gratitude aos meus directores, o Dr. Jesús Lamas Fernández e o Dr. Manuel Noia Guldrís, pola súa exemplar dirección durante toda a miña etapa predoutoral e pola revisión do manuscrito desta tese.

A Suso, por darme a oportunidade de realizar esta tese no seu laboratorio e tamén pola súa confianza, a súa paciencia e os seus consellos, científicos e persoais. Grazas por ter sempre a porta do teu despacho aberta para min, valorar as miñas ideas e ser un mentor ao xeito clásico. E grazas tamén por tirar de min cando me faltaban as forzas.

A Manolo, pola súa axuda no laboratorio, paciencia, ánimos e consellos en tempos difíciles. Tamén porque, dándome a oportunidade de realizar o TAD baixo a súa dirección, fixo nacer en min o interese pola Ciencia que me trouxo ata aquí. Grazas pola túa dedicación durante a corrección do manuscrito desta tese. E, sobre todo, grazas por non esquecer que un día tamén ti fuches doutorando.

Ao Dr. José Manuel Leiro Vidal, pola súa excelente dirección no desenvolvemento dos adxuvantes. Grazas tamén por esas estimulantes charlas sobre ciencia coas que sempre se nos escapaba o tempo das mans. Aínda que a burocracia non permitiu que asines como tal, ti es o terceiro director desta tese.

Quero mostrar tamén a miña gratitude a todas as maravillosas persoas que coñecín grazas a esta etapa:

A Alejandra, pola súa inestimable axuda no laboratorio. Non me esquezo daquel día que apareciches ás cinco da maná para axudarme con aquel experimento. Grazas tamén por esas conversacións sobre todo e nada que fixeron os días no laboratorio moito máis interesantes. Grazas pola túa fortaleza e por dicir as cousas que non sempre se queren escoitar, pero que necesitan ser ditas. E, para rematar, grazas por converterte nunha amiga xa indispensable.

A Vero, polo magnífico dominio do Origin, por ser a Maestra das qPCRs e pola enorme axuda coa parte experimental da tese. Tamén por ser a psicóloga do grupo e mostrar sempre o punto medio das cousas. Grazas por ser unha amiga leal e estar sempre disposta a escoitar.

Aos rapaces dos labs. 3 e 4, Santi, Isma, Dani e Natalia. A Santi, por estar sempre disposto a botar unha man e por ser un exemplo a seguir. A Isma, porque a súa sensatez é un *Norte* que a experiencia di que sempre hai que ter en conta. A Dani, por esa alegría explosiva que

contaxia. A Natalia, pola súa inspiradora paixón pola Ciencia. A Santi e a Isma agradézoilles tamén o seu apoio durante o *derradeiro movemento* desta tese.

A todas as que pasastes polo Lab. 2: Berta, Natalia, Rosa Ana, Iria, Paula, Laura, María, Ilenia e Cordelia; pola vosa compañía e axuda.

A la Dra. Carolina Tafalla, por darme la oportunidad de realizar una estancia en su laboratorio y a la Dra. Itziar Estensoro, por su ayuda con el procesado de muestras y la realización de las qPCR. A Marga e Jessica, pola súa dedicación co acuario. Ao Dr. Francisco Salgado e a Juanjo, pola súa axuda e paciencia coa citometría de fluxo. A Merche e Montse, polo seu magnífico dominio do microscopio confocal. A Fátima, pola súa axuda coa perfusión.

Quero tamén expresar a miña gratitude e cariño á miña familia e aos meus amigos:

A meus pais, Concha e Armando. Grazas por confiar en min e apoiarme incondicionalmente agora e sempre. Se cheguei ata aquí foi grazas a vós. Nada do que poida dicir será suficiente, así que só podo dicirvos: grazas por todo.

Á miña avoa, aos meus padriños e aos meus primos, porque son a mellor familia que se pode ter. Grazas tamén, avoa Felita, por confiar sempre en min máis ca min mesmo. Grazas tamén a vós, avoa Aurora, avó Francisco e tía Manuela, oxalá estivesedes aquí comigo.

A Eva, por estar sempre e entenderme. É este un agradecemento seco, pero profundo e sincero, coma ti. Grazas, Eva.

A Saúl, Carlos, Ricardo e Ramón por esas fins de semana en Forcarei que nunca esquecerei.

A Jesús e Anxo, amigos acordeonistas, por esas mañás que se convertían en noites, entre *pulpo* e boa música.

A Isidoro, *Felis silvestris catus*, por axudarme co mecanografado da tese, á súa maneira, pero con boa intención.

Á Ciencia, pola frustración e a emoción, polo cortisol e a dopamina:

*Then felt I like some watcher of the skies
When a new planet swims into his ken;
Or like stout Cortez when with eagle eyes
He star'd at the Pacific—and all his men
Look'd at each other with a wild surmise—
Silent, upon a peak in Darien.*

John Keats

Grazas a todos!

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la financiación recibida a través de las siguientes ayudas y proyectos de investigación:

Ayuda de formación de personal investigador:

Ayuda de formación de personal investigador: Xunta de Galicia (DOG 75, p.15319). Ayuda de apoyo a la etapa predoctoral del Plan gallego de investigación, innovación y crecimiento 2011-2015 (Plan I2C) del año 2014.

Ayudas a programas de consolidación y estructuración de unidades de investigación competitivas del sistema universitario de Galicia (SUG):

Ayudas a programas de consolidación y estructuración de unidades de investigación competitivas del sistema universitario de Galicia (SUG). Modalidad: Grupos de referencia competitiva (GRC). Nº expediente: ED431C 2017/31. Inicio-fin: 2017-2010. Entidad subvencionadora: Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria. Dirección Xeral de Promoción Científica do Sistema Universitario de Galicia. Programa de Consolidación y Estructuración de Unidades de Investigación Competitivas.

Proyectos de investigación en convocatorias competitivas:

Avances en la vacunación en peces planos (VACUPLAN): formulación vacunal específica. Entidad financiadora: Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI). Ministerio de Economía y Competitividad. Referencia: IDI-20160679.

Advanced tool and research strategies for parasite control in european farmed fish. Parafishcontrol. Scientific basis and tools for preventing and mitigating parasitic diseases of European farmed fish. Horizon 2020-Research and Innovation Framework Programme. Referencia: 634429-2.

Diseño y elaboración de nuevas vacunas que permitan una mayor protección frente a escuticociliados parásitos del rodaballo. Proyecto I+D+I, Programa estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación orientada a los retos de la sociedad, Convocatoria 2014. Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. Referencia: AGL2014-57125-R.

Generación de vacunas recombinantes para la inmunoprolaxis de la escuticociliatosis del rodaballo. Proyecto I+D+I, Programa estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación orientada a los retos de la sociedad, Convocatoria 2017. Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. Referencia: AGL2017-83577-R.



A meus pais, Concha e Armando



ABREVIATURAS, SIGLAS Y ACRÓNIMOS

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ADN complementario.

ADORA2A: receptor de adenosina A2a, *adenosine A2A receptor*.

AID: desaminasa de citidina inducida por activación, *activation-induced cytidine deaminase*.

ALRs: receptores tipo AIM-2, *absent in melanoma 2 (AIM2)-like receptors*.

ANXA1: anexina A1, *anexin A1*.

APLP1: proteína precursora amiloide beta (A4), *amyloid-like protein beta A4 precursor protein*.

APROMAR: asociación empresarial de acuicultura de España.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero.

BCR: receptor de linfocitos B, *B cell receptor*.

BOC: *cell adhesion associated oncogene regulated*.

BSA: albúmina de suero bovina, *bovine serum albumin*.

C6: componente 6 del complemento, *complement component 6*.

CASP8: caspasa 8, *caspase 8*.

CD: *cluster of differentiation*.

CDH1: cadherina-E, *E-cadherin*.

CDH2: cadherina 2, *cadherin-2*.

cGAS–STING: *cyclic GMP-AMP synthase (CGAS)- Stimulator of interferon genes (STING)*.

CLDN1: claudina 1, *claudin-1*.

CLDN3A: claudina 3, *claudin-3A*.

CLRs: receptores de lectina de tipo C, *C-type lectin receptors*.

CM: carboximetilcelulosa metacrilatada.

CMC: carboximetilcelulosa.

CR: dominio rico en cisteína, *cysteine-rich domain*.

CRD: dominios de reconocimiento de carbohidratos, *carbohydrate recognition domain*.

CSR: recombinación de cambio de clase, *class switch recombination*.

CTLD: dominio de lectina tipo C, *C-type lectin-like domain*.

CTLs: células T citotóxicas, *cytotoxic T cells*.

CVM: masas de células y vacuna, *cell-vaccine mass*.

CXCL: *chemokine (C-X-C motif) ligand*.

DAB: 3,3'-diaminobencidina.

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol, *4',6-diamidino-2-phenylindole*.

DAPL1: proteína 1-A asociada a muerte celular, *death-associated protein-like 1*.

DEG: genes expresados diferencialmente, *differentially expressed genes*.

DHCR24: 24-deshidrocolesterol reductasa, *24-Dehydrocholesterol reductase*.

DMSO: dimetilsulfósido, *dimethyl sulfoxide*.

dNTPs: desoxinucleósidos trifosfato, *deoxy-nucleoside triphosphates*.

dsRNA: ARN de doble cadena, *double stranded RNA*.

DTT: ditioneitol, *dithiothreitol*.

EDTA: ácido etilendiaminetetraacético, *ethylenediaminetetraacetic acid*.

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, *enzyme-linked immunosorbent assay*.

EPO: peroxidasa de eosinófilos, *eosinophil peroxidase*.

FAO: organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura, *food and agriculture organization*.

FasL: ligando Fas, *Fas ligand*.

FBS: suero fetal bovino, *fetal bovine serum*.

FC: cambio de proporción, *fold change*.

Fc: receptor Fc, *Fc (fragment, crystallizable) receptor*.

FCA: adyuvante completo de Freund, *Freund's complete adjuvant*.

FDC: células dendríticas foliculares, *follicular dendritic cells*.

FIA: adyuvante incompleto de Freund, *Freund's incomplete adjuvant*.

FN: fibronectina, *fibronectin*.

FSGD: duplicación del genoma específica de peces, *fish-specific genome duplication*.

GADPH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*.

GATA3: Proteína 3 de unión a GATA.

GC: centros germinales, *germinal centers*.

GILT: reductasa lisosómica inducible por interferón gamma, *gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase*.

GO: ontología génica, *gene ontology*.

GSN: gelsolina, *gelsolin*.

HEPES: ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazineetanesulfónico, *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*.

HRP: peroxidasa de rábano, *horseradish peroxidase*.

IC: inmunocomplejos.

IFN: interferón.

Ig: inmunoglobulina.

IL: interleucina.

INF2: formina invertida 2, *inverted formin-2*.

IRIV: virosomas de influenza reconstituidos inmunopotenciadores, *immunopotentiating reconstituted influenza virus virosome*.

ITGA1: integrina 1-alfa, *integrin subunit alpha 1*.

KEGG: enciclopedia Kyoto de genes y genomas, *Kyoto encyclopedia of genes and genomes*.

KLH: hemocianina de *Megathura crenulata*, *keyhole limpet hemocyanin*.

LEAP: péptido antimicrobiano expresado en el hígado, *liver-expressed antimicrobial peptide*.

LFA-1: antígeno 1 asociado a la función del linfocito, *lymphocyte function-associated antigen 1*.

LPS: lipopolisacárido.

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad, *major histocompatibility complex*.

MM: melanomacrófago, *melanomacrophage*.

MMCs: centros melanomacrofágicos, *melanomacrophages centers*.

MMIF: factor inhibidor de la migración de macrófagos, *macrophage migration inhibitory factor*.

MMR1: receptor de manosa de macrófagos, *macrophage mannose receptor 1*.

MPL: monofosforil lípido A, *monophosphoryl lipid A*.

MPO: mieloperoxidasa.

MR: receptor de manosa, *mannose receptor*.

MRC1: receptor de manosa tipo C-1, *C-type mannose receptor 1*.

MRC2: receptor de manosa tipo C-2, *C-type mannose receptor 2*.

MS-222: tricaína metano sulfonato, *tricaine methanesulfonate*.

NBT: nitroazul de tetrazolio, *nitro blue tetrazolium*.

NCAM: molécula de adhesión celular neural, *neural cell adhesion molecule*.

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*.

NET: trampas extracelulares de neutrófilos, *neutrophil extracellular traps*.

NGS: suero normal de cabra, *normal goat serum*.

NK: células *natural killer*.

NLRs: receptores tipo Nod, *nucleotide-binding oligomerization domain (Nod)-like receptors*.

OCT: *optimum cutting temperature*.

ORF: marco abierto de lectura, *open reading frame*.

OVA: ovoalbúmina, *ovalbumin*.

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos, *pathogen-associated molecular patterns*.

PARVAA: alfa-parvina, *alpha-parvin*.

PAS: ácido periódico de Schiff, *periodic acid-Schiff*.

PAWR: *prkc*, *apoptosis*, *WT1*, *regulator*.

PBS: tampón fosfato salino, *phosphate buffered saline*.

PCNA: antígeno nuclear de proliferación celular, *proliferating cell nuclear antigen*.

PFN2: profilina 2, *profilin-2*.

Ph: solo antígeno particulado de *P. dicentrarchi*.

PLA2R: receptor de la fosfolipasa A2, *phospholipase A2 receptor*.

PLGA: *poly(lactic-co-glycolic acid)*.

PMA: forbol 12-miristato 13-acetato, *phorbol 12-myristate 13-acetate*.

PMNs: neutrófilos polimorfonucleares, *polymorphonuclear neutrophils*.

Poly I:C: *polyinosinic:polycytidylic acid*.

PPARG: *peroxisome proliferator activated receptor gamma*.

PRC: reacción en cadena de la polimerasa, *polymerase chain reaction*.

PRRs: receptores de reconocimiento de patrones, *pattern recognition receptors*.

PTPRK: *receptor-type tyrosine protein phosphate kappa*.

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, *quantitative polymerase chain reaction*.

RACE: amplificación rápida de los extremos del ADNc, *rapid amplification of cDNA ends*.

RARA: receptor de ácido retinoico alfa, *retinoic acid receptor alpha*.

RIA: residuo insoluble en alcohol.

RLRs: receptores tipo RIG-I, *retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I)-like receptors*.

RPS: porcentaje relativo de supervivencia, *relative percent survival*.

RT: transcriptasa reversa, *reverse transcriptase*.

SDC3: sindecán 3, *sydecan 3*.

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico, *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*.

SHM: hipermutación somática, *somatic hypermutation*.

TBS: solución salina tamponada con tris, *tris-buffered saline*.

TBX21: factor de transcripción caja T 21, *T-box transcription factor TBX21*.

TCF7: factor de transcripción 7, *transcription factor 7*.

TCR: receptor de linfocitos T, *T cell receptor*.

TG2: transglutaminasa 2b, *transglutaminase 2b*.

TGF: factor de crecimiento transformante, *transforming growth factor*.

Th: T colaboradores, *T helper*.

TLR: receptor tipo Toll, *Toll-like receptor*.

TNF: factor de necrosis tumoral, *tumoral necrosis factor*.

Tris: tris(hidroximetil)aminometano,
tris(hydroxymethyl)aminomethane.

UM: ulvano metacrilatado.

UQa: hidrogel de ulvano-quitosano a.

UQb: hidrogel de ulvano-quitosano b.

UTR: región no codificante, *untranslated region*.

VLR: receptor variable de linfocitos, *variable lymphocyte receptor*.

Los genes y proteínas de rodaballo (*Scophthalmus maximus*) se han representado empleando la nomenclatura de pez cebra (*Danio rerio*), según las convenciones de nomenclatura para el pez cebra de ZFIN (*The Zebrafish Information Network*), recogidas en: <https://wiki.zfin.org/display/general/ZFIN+Zebrafish+Nomenclature+Conventions>

Los genes de ratón (*Mus musculus*) se han representado según las directrices de MGI (*Mouse Genome Informatics*), recogida en: <http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/gene.shtml>

Cuando se hace una referencia general a un gen o proteína, se ha empleado la nomenclatura de humanos, según las directrices del Comité de Nomenclatura de Genes de la HUGO (*Human Genome*

Organisation) (*HUGO Gene Nomenclature Committee*, HGNC), recogidas en <https://www.genenames.org/about/guidelines/>

Algunos de nombres de los genes del Capítulo I no han sido traducidos debido a que no hemos encontrado en la bibliografía su nombre en castellano.





RESUMEN

En esta tesis doctoral se ha analizado la respuesta inmunitaria innata y adaptativa del rodaballo durante la vacunación con el escuticociliado *Philasterides dicentrarchi* y se han desarrollado nuevos adyuvantes basados en polímeros de origen natural.

Capítulo 1

Se ha empleado un chip de ADN para examinar los cambios en la expresión génica en células peritoneales de rodaballo después de la inyección con vacunas que contienen antígeno de membrana de *P. dicentrarchi* y uno de los siguientes adyuvantes: microesferas de quitosano-PVMMA, adyuvante completo de Freund, gel de hidróxido de aluminio o Matrix-Q. Se identificaron 374 genes que se expresaron diferencialmente en todos los grupos de peces. Cuarenta y dos genes relacionados con uniones estrechas y adherencias focales y/o citoesqueleto de actina se expresaron diferencialmente en las células peritoneales libres. Los cambios profundos en la expresión génica relacionados con la adherencia celular y el citoesqueleto pueden estar asociados con la migración celular y también con la formación de masas de vacuna y células y su unión a la pared peritoneal. Además, se expresaron diferencialmente treinta y cinco genes relacionados con la apoptosis. Aunque la mayoría de las proteínas codificadas por estos genes tienen un efecto proapoptótico, otras son antiapoptóticas, lo que

indica que ambos tipos de señales se producen en los leucocitos peritoneales de los peces vacunados. Curiosamente, muchos de los genes relacionados con los linfocitos y su actividad se regularon negativamente en los grupos inyectados con la vacuna. También se ha observado una disminución en la expresión de genes relacionados con la presentación del antígeno, lo que sugiere que los macrófagos, que son abundantes en la cavidad peritoneal después de la vacunación, no los expresaron durante la respuesta inflamatoria temprana en la cavidad peritoneal. Finalmente, varios genes que participan en la respuesta inflamatoria se expresaron diferencialmente, y la mayoría participó en la resolución de la inflamación, lo que indica que se genera una respuesta de macrófagos M2 en la cavidad peritoneal de los peces un día después de la vacunación.

Capítulo 2

El bazo de peces es un órgano rico en linfocitos, particularmente en linfocitos B, que desempeña un papel relevante en la respuesta inmunitaria adaptativa después de la vacunación. Se han analizado las poblaciones de células B (células positivas para IgM, IgT o IgD) y la expresión génica de las inmunoglobulinas *igm*, *igt* e *igd* y de varios genes relacionados con el sistema inmunitario en el bazo de rodaballos inmunizados con una vacuna que contiene un adyuvante oleoso y antígeno entero inactivado de *P. dicentrarchi*. Los peces se inmunizaron los días 0 y 30, y las muestras se obtuvieron en los días 3,

7, 33, 37 y 60. La vacuna provocó un aumento significativo en la IgM sérica específica a 37 días y a 60 días, pero los niveles específicos de IgT no variaron en los peces vacunados. No se encontró una gran regulación de *sigt*, *migt*, *sigm*, *migm* e *igd* antes de 37 días, mientras que a 37 días se detectó una regulación positiva del gen *sigt* en peces inyectados con vacuna. Además, a tiempos más cortos la expresión de las inmunoglobulinas se reguló negativamente en el grupo vacuna. Además, se produjo una pobre regulación de los genes relacionados con el sistema inmunitario. Por otra parte, se diseñó un anticuerpo que reconoce, en suero de rodaballo, una banda de alrededor de 70 kDa en Western blot, que ha sido identificada como la cadena pesada de la IgT mediante espectrofotometría de masas. La identificación de linfocitos B por inmunofluorescencia permitió su clasificación en cuatro poblaciones: $IgM^+IgD^-IgT^-$ (la mayoría de las células IgM^+), $IgM^+IgD^+IgT^-$, $IgM^-IgD^+IgT^-$ (muy pocas células) e $IgM^-IgD^-IgT^+$. Las células IgM^+ e IgT^+ aparecieron dispersas por todo el parénquima del bazo o agrupadas alrededor de los vasos y del tejido linfoide asociado a los centros melanomacrofágicos (MMCs). La proliferación celular se determinó mediante el uso de una combinación de anticuerpos anti-IgT o anti-IgM y anti-PCNA. La proliferación de células B se observó casi exclusivamente en el tejido linfoide asociado a los MMCs. Durante la vacunación o infección con *P. dicentrarchi*, el número y el tamaño de MMCs aumentó, observándose en todos ellos células B (IgT^+ o IgM^+) en proliferación. La vacunación generó un aumento en la cantidad y en

la proliferación de células B IgM⁺ e IgT⁺, y de otros tipos celulares, en el área de tejido linfoide que rodea a los MMCs, lo cual sugiere una cierta analogía de esta zona con los centros germinales de mamíferos y aves. Además, se observaron células B IgM⁺ o IgT⁺ (muchas de ellas en proliferación) en la masa de vacuna y células (CVM) asociada al bazo, lo que puede indicar cierta relevancia de la CVM durante la vacunación, siendo más que un mero lugar de fagocitosis e intercambio de material.

Capítulo 3

El receptor de manosa (MRC1) es un receptor de unión a carbohidratos expresado en algunas poblaciones de macrófagos, células dendríticas y endotelio no vascular que juega un papel importante en la internalización y presentación de antígeno. Aunque existe abundante información sobre este receptor en mamíferos, se sabe poco sobre su modulación durante la vacunación en peces. En este estudio hemos clonado y secuenciado la región codificante de dos genes del receptor de manosa tipo C-1, que hemos denominado *mrc1-1* y *mrc1-2*. Se identificaron cuatro dominios potenciales (péptido señal, dominios extracelulares, región transmembrana y dominio citoplasmático) en ambas moléculas. La región extracelular está formada por un dominio N-terminal rico en cisteína (CR), uno de fibronectina tipo II (FNII) y ocho dominios de lectina tipo C (CTLD). Además, están presentes otros sitios importantes para la regulación de la actividad del receptor de

manosa: residuos conservados de cisteína y residuos aromáticos F (Phe) y W (Trp), sitios conservados (EPN y WND) de dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRD), sitios de unión a Ca^{+2} , dos motivos potenciales de endocitosis (F-N-Y y LX) y el residuo ácido conservado “D”. La masa molecular prevista de las proteínas Mrc1-1 y Mrc1-2 es de 162,5 kDa y 162,4 kDa, respectivamente, y ambas moléculas muestran una identidad del 44,71%. Los porcentajes de identidad de las dos isoformas están en torno al 39-50% con mamíferos y aves, y entre el 37-49% con reptiles y anfibios. Se ha diseñado un anticuerpo Anti-Mrc1-1 que reconoce una banda de alrededor de 158 kDa. Mediante inmunohistoquímica, identificamos células Mrc1⁺ dispersas en el riñón y el bazo, cuya morfología es compatible con macrófagos. Los dos genes mostraron una mayor expresión constitutiva en riñón anterior y en el bazo. Además, se estudió la regulación de *mrc1-1* y *mrc1-2* durante la vacunación con *P. dicentrarchi* y el adyuvante oleoso MontanideTM ISA 763 A VG. Ambos genes se regularon positivamente en riñón anterior y bazo de grupos inyectados con adyuvante y antígeno, indicando una interacción entre el escuticociliado y el sistema inmunitario innato del rodaballo.

Capítulo 4

La mieloperoxidasa (MPO) es una enzima que está presente principalmente en los neutrófilos. Aunque esta proteína está bien caracterizada en mamíferos, se sabe poco sobre su estructura y función

en peces. En este trabajo, se secuenció el gen de la peroxidasa de neutrófilos de rodaballo y se estudiaron algunas de sus funciones. El gen de la mieloperoxidasa de rodaballo, de 5690 pb, contiene un ORF con 14 exones. Además de los 13 intrones del ORF, hay un intrón de 134 nucleótidos ubicado en la región 5' UTR. Las regiones 5' y 3' no traducidas tienen 111 pb y 970 pb, respectivamente. La secuencia codificante contiene 2301 nucleótidos que codifican un polipéptido de 767 aminoácidos con una masa molecular predicha de 86,21 kDa. El análisis filogenético indica que la peroxidasa de neutrófilos de rodaballo presenta una mayor similitud con la peroxidasa de eosinófilos de otras especies de peces y de mamíferos. Se determinó que la Mpo de rodaballo tiene varios dominios conservados: el péptido señal, el propéptido (118 aminoácidos) y las cadenas ligera (113 aminoácidos) y pesada (591 aminoácidos). Otros sitios importantes para la regulación de la actividad MPO también están presentes en la Mpo de rodaballo, incluidas las cavidades distales del hemo I y II y el hemo proximal cavidades I y II. Varios residuos catalíticos, de enlace hemo y cisteína, un motivo de unión a Ca^{+2} y también ocho sitios potenciales de glucosilación unidos a N fueron identificados. El análisis efectuado por Western blot empleando un anticuerpo policlonal anti-Mpo reveló que la Mpo de rodaballo existe en su forma madura como un homodímero de aproximadamente 150 kDa en el riñón anterior, bazo, líquido peritoneal y suero, lo que indica que la proteína pierde el propéptido durante maduración. El gen de la *mpo* mostró mayor expresión

constitutiva en el riñón anterior, branquia, glóbulos blancos y bazo, y menor en hígado, músculo, corazón y cerebro. Mediante inmunofluorescencia, se identificaron células compatibles con neutrófilos que contienen gránulos de Mpo en el riñón anterior, bazo y leucocitos de sangre. En un en prueba de estimulación *in vitro*, se aislaron leucocitos de riñón anterior y se estimularon con la Mpo de rodaballo purificada, obtenida mediante cromatografía de afinidad. La incubación de los HKL con la Mpo de rodaballo reguló positivamente las citocinas proinflamatorias *tnfa*, *il12b* e *il17*; la enzima proinflamatoria *lox*; el factor inhibidor de la migración de macrófagos (*mmif*) y los genes que codifican las integrinas CD11b y CD18. Esto sugiere que, además de su actividad microbicida, la Mpo puede actuar como mediador de la respuesta inmunitaria en peces.

Capítulo 5

La vacunación se considera la mejor forma de controlar las enfermedades infecciosas en acuicultura. Sin embargo, la mayoría de los adyuvantes utilizados en la acuicultura, especialmente los adyuvantes oleosos, causan daños a los peces, provocando un retraso del crecimiento y efectos negativos en su bienestar. En este estudio se han desarrollado varios adyuvantes basados en los polisacáridos de origen natural carboximetilcelulosa, quitosano o ulvano: gel de ulvano, carboximetilcelulosa metacrilatada, ulvano metacrilatado, ulvano-quitosano a y ulvano-quitosano b. De estos, se seleccionaron tres

formulaciones y se probaron en ratones y/o rodaballos: carboximetilcelulosa metacrilatada (CM), ulvano metacrilatado (UM) y ulvano-quitosano b (UQb). Los tres adyuvantes estimularon el estallido respiratorio de leucocitos de riñón anterior de rodaballo, aunque el ulvano-quitosano b fue el que mejor respuesta mostró. Además, se inmunizaron ratones y rodaballos y se analizó el perfil Th1/Th2 generado en ratones mediante ELISA, midiendo el nivel de IgG_{2a} e IgG₁ específicas. También se estudió la expresión temprana de los genes *tbx21*, *gata3*, *ifng* e *il4*, observándose una regulación positiva en todos los adyuvantes testados, a excepción del hidróxido de aluminio. Además, se inyectaron peces, a 0 y 30 días, con el adyuvante oleoso Montanide ISA 763 A VG y antígeno entero de *P. dicentrarchi* o el nuevo adyuvante ulvano-quitosano b (2 mg/pez) y antígeno particulado del ciliado. A los 30 días de la dosis de refuerzo, el nivel de IgM específica fue mayor en el grupo UQb. Por otra parte, se llevó a cabo una infección experimental, obteniéndose una protección similar con los dos adyuvantes, aunque el grupo UQb generó muchos menos daños en la cavidad peritoneal. El UQb es biodegradable y económico, e induce unos altos niveles de protección, provocando muchos menos daños que los adyuvantes oleosos. Todo esto hace de esta nueva vacuna una buena alternativa para combatir la escuticociliatosis en el rodaballo.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Rodaballo.....	3
2. Alimentación humana y acuicultura	6
3. Enfermedades parasitarias del rodaballo	10
3.1. <i>Philasterides dicentrarchi</i>	11
4. Sistema inmunitario.....	14
4.1. Sistema inmunitario innato.....	15
4.2. Sistema inmunitario adquirido	21
4.3. Relación entre el sistema inmunitario innato y el adquirido.....	28
5. Vacunación	33
5.1. Tipo de vacunas según el tipo de antígeno.....	35
5.2. Ruta de administración de las vacunas.....	36
5.3. Adyuvantes.....	37
6. Bibliografía.....	43
OBJETIVOS	83

CAPÍTULO I: MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN CÉLULAS PERITONEALES DEL RODABALLO TRAS LA VACUNACIÓN

1. Introducción.....	87
2. Material y métodos	90

2.1. Animales de experimentación.....	90
2.2. <i>Philasterides dicentrarchi</i> : cultivo y preparación del antígeno de membrana	90
2.3. Preparación y administración de la vacuna.....	92
2.4. Determinación de IgM específicas mediante ELISA en suero de rodaballo	93
2.5. Aislamiento de las células peritoneales	94
2.6. Extracciones de ARN e hibridación del <i>microarray</i>	95
2.7. Análisis del <i>microarray</i>	96
2.8. Validación del <i>microarray</i> mediante qPCR.....	98
2.9. Análisis estadístico.....	100
3. Resultados y discusión	101
3.1. Dinámica celular en la cavidad peritoneal después de la vacunación	101
3.2. Validación de los <i>microarrays</i> mediante qPCR.....	102
3.3. Análisis de los genes que se expresan diferencialmente.....	103
3.4. La vacunación incrementa la expresión de genes involucrados en la adhesión celular y en el citoesqueleto de actina	106
3.5. Regulación de la apoptosis	113
3.6. Los genes asociados con la actividad y migración de linfocitos se regulan negativamente	116
3.7. Regulación de la respuesta inflamatoria	120

3.8. Comparación de la expresión génica entre grupos	125
3.9. Comparación entre la expresión génica en células peritoneales y los niveles de anticuerpos en suero	128
4. Bibliografía	129

CAPÍTULO II: RESPUESTA HUMORAL EN EL BAZO DURANTE LA VACUNACIÓN CON *Philasterides dicentrarchi*

1. Introducción	145
2. Material y métodos	150
2.1. Animales de experimentación	150
2.2. Vacunación	151
2.3. Cultivo de <i>P. dicentrarchi</i> e infección experimental.....	151
2.4. Toma de muestras.....	152
2.5. Producción del anticuerpo anti-IgT de rodaballo y validación por Western blot y espectrometría de masas	153
2.6. Determinación del nivel de anticuerpos específicos en suero	155
2.7. Inmunofluorescencia	157
2.8. PCR cuantitativa (con transcriptasa inversa) (RT-qPCR)	158
2.9. Análisis estadístico	161
3. Resultados.....	161

3.1. Validación de los anticuerpos anti-IgT generados a partir de péptidos.....	161
3.2. Puesta a punto de los anticuerpos anti-IgM y anti-IgT en inmunofluorescencia	164
3.3. Nivel de anticuerpos específicos en suero.....	165
3.4. Estructura de un centro melanomacrofágico y cambios durante la vacunación	167
3.5. Distribución de células B IgM ⁺ , IgT ⁺ e IgD ⁺ en el bazo de peces control y estudio de la proliferación celular	173
3.6. Distribución y proliferación de células B IgM ⁺ e IgT ⁺ en el bazo durante la vacunación	180
3.7. Presencia de linfocitos IgM ⁺ e IgT ⁺ en masas de células y vacuna adyacentes al bazo de peces vacunados.....	189
3.8. Distribución y proliferación de células B IgM ⁺ e IgT ⁺ en el bazo de peces supervivientes	191
3.9. Expresión de inmunoglobulinas en el bazo de peces vacunados	197
3.10. Evaluación de la expresión de varios genes relacionados con el sistema inmunitario en el bazo de peces vacunados	202
4. Discusión.....	205

5. Bibliografía.....	218
----------------------	-----

CAPÍTULO III: RECEPTORES DE MANOSA TIPO C-1 DEL RODABALLO. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DURANTE LA VACUNACIÓN

1. Introducción.....	239
2. Material y métodos	242
2.1. Animales de experimentación	242
2.2. Vacunación.....	243
2.3. Toma de muestras.....	243
2.4. Producción del anticuerpo Anti-Mrc1-1 y validación por Western blot	244
2.5. Inmunohistoquímica.....	246
2.6. Amplificación rápida de los extremos del ADNc (RACE)	247
2.7. PCR cuantitativa (con transcriptasa inversa) (RT-qPCR)	248
2.8. Análisis bioinformático	250
2.9. Análisis estadístico	251
3. Resultados.....	251
3.1. Estructura de los receptores Mrc1-1 y Mrc1-2 de rodaballo	251
3.2. Relaciones filogenéticas de los receptores de manosa de rodaballo	263
3.3. Detección del Mrc1-1 mediante Western blot.....	268

3.4. Expresión basal de <i>mrc1-1</i> y <i>mrc1-2</i> en diferentes órganos	269
3.5. Análisis de la expresión de <i>mrc1-1</i> y <i>mrc1-2</i> durante la vacunación.....	270
3.6. Identificación de células Mrc1-1 positivas en riñón anterior y bazo	274
4. Discusión.....	276
5. Bibliografía	280
CAPÍTULO IV: PEROXIDASA DE NEUTRÓFILOS DE RODABALLO. CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS FUNCIONAL	
1. Introducción	289
2. Material y métodos.....	292
2.1. Animales de experimentación.....	292
2.2. Obtención de leucocitos de riñón anterior	293
2.3. Extracción de ADN y ARN	293
2.4. Clonación y secuenciación del gen de la mieloperoxidasa de rodaballo.....	294
2.5. Análisis bioinformático.....	296
2.6. Recolección y procesamiento de tejidos	297
2.7. Análisis de las muestras por Western blot	298
2.8. Inmunofluorescencia.....	299
2.9. PCR cuantitativa (con transcriptasa inversa) (RT-qPCR).....	300

2.10.	Expresión de varios genes relacionados con el sistema inmunitario en leucocitos de riñón anterior estimulados	302
3.	Resultados.....	303
3.1.	Gen completo	303
3.2.	Análisis de las muestras mediante Western blot	318
3.3.	Expresión de la mieloperoxidasa de rodaballo en diferentes tejidos.....	319
3.4.	Localización de células peroxidasa-positivas por inmunofluorescencia	320
3.5.	Modificación de la expresión génica en leucocitos de riñón incubados con mieloperoxidasa de rodaballo	322
4.	Discusión	323
5.	Bibliografía	332

**CAPÍTULO V: DESARROLLO DE NUEVOS ADYUVANTES
PARA LA VACUNACIÓN DEL RODABALLO FRENTE A
*Philasterides dicentrarchi***

1.	Introducción.....	345
2.	Material y métodos	351
2.1.	Animales de experimentación	351
2.1.1.	Peces.....	351
2.1.2.	Ratones.....	351
2.2.	Extracción de ulvano	352

2.3. Elaboración de adyuvantes	354
2.3.1. Gel de ulvano.....	354
2.3.2. Ulvano metacrilatado.....	354
2.3.3. Carboximetilcelulosa metacrilatada.....	355
2.3.4. Hidrogel de ulvano-quitosano a.....	355
2.3.5. Hidrogel de ulvano-quitosano b.....	356
2.4. Capacidad de inducción del estallido respiratorio en leucocitos de riñón anterior	356
2.5. Cultivo <i>P. dicentrarchi</i> , extracción del antígeno de membrana y preparación del antígeno particulado	357
2.6. Inmunizaciones	358
2.7. Infección experimental de rodaballos con <i>P. dicentrarchi</i>	360
2.8. Extracción de ARN y cuantificación de la expresión génica en células peritoneales libres de ratón mediante qPCR	361
2.9. Determinación de anticuerpos específicos mediante ELISA en suero de ratón	363
2.10. Determinación de IgM específicas mediante ELISA en suero de rodaballo.....	364
2.11. Análisis estadístico.....	365
3. Resultados	366

3.1. Adyuvantes	366
3.2. Actividad estallido respiratorio en leucocitos de rodaballo	366
3.3. Nivel de anticuerpos específicos y perfil Th1/Th2 en ratones inmunizados con antígeno y adyuvante UM o CM	368
3.4. Expresión de factores de transcripción y citocinas en células peritoneales de ratón.....	372
3.5. Vacunación con carboximetilcelulosa metacrilatada y ulvano metacrilatado en rodaballo	375
3.6. Análisis del hidrogel de ulvano-quitosano b: efecto sobre el nivel de IgM en suero y sobre la protección frente a <i>P. Dicentrarchi</i> en rodaballo	376
4. Discusión	380
5. Bibliografía.....	389
CONCLUSIONES	407
ANEXOS	413





INTRODUCCIÓN GENERAL



Introducción general

1. Rodaballo

El rodaballo, *Scophthalmus maximus* (Linnaeus, 1758), es una especie de teleosteo marino de vida demersal perteneciente al orden de los Pleuronectiformes y a la familia Scophthalmidae, la cual se distribuye en el Atlántico Norte, Mar Báltico, Mar Mediterráneo y Mar Negro (Nelson *et al.*, 2016) (Fig. 1). Aunque la nomenclatura de esta especie fue objeto de debate durante décadas, apareciendo en la literatura como *Psetta maxima* o *Scophthalmus maximus*, la controversia parece resuelta en favor de la segunda denominación en base a su anatomía, sistemática filogenética molecular y morfológica y a la ecología de los peces de la familia Scophthalmidae (Bailly y Chanet, 2010). Los peces planos, entre los cuales se incluye el rodaballo, presentan una fuerte asimetría especialmente marcada por la migración de un ojo durante el paso de una etapa larvaria simétrica a una etapa adulta asimétrica, lo cual es considerado como una de las más extraordinarias especializaciones encontradas entre los vertebrados (Friedman, 2008). El rodaballo, aunque carece de escamas, presenta en su superficie corporal cenital unas estructuras óseas pequeñas, aisladas y mineralizadas denominadas tubérculos (Zylberberg *et al.*, 2003). Esta especie presenta dimorfismo sexual tanto en el crecimiento como en la maduración, siendo las hembras las que muestran una mayor tasa de crecimiento en relación a los machos

(Imsland *et al.*, 1997). La dieta del rodaballo, aunque carnívora, varía durante todo su ciclo de vida, alimentándose en el norte del Mar Báltico de macrofauna y peces durante su etapa juvenil, de anfípodos durante su etapa adulta si su tamaño no supera los 30 mm y de camarones, anfípodos y pescado cuando supera este tamaño (Aarnio *et al.*, 1996).

La duplicación del genoma es una fuente de incremento de la complejidad de los organismos durante la evolución (Ohno, 1970). En los vertebrados tetrápodos y tiburones han ocurrido dos duplicaciones de todo el genoma denominadas 1R y 2R, respectivamente. Análisis filogenéticos han establecido que, además de las dos duplicaciones del genoma 1R y 2R de los tetrápodos y tiburones, en peces actinopterigios ocurrió una tercera duplicación hace 350 millones de años, denominada 3R o duplicación del genoma específica de peces (FSGD) (Meyer y Van der Peer, 2005). Esto explica la gran cantidad de genes parálogos que presentan estos organismos, incluidos los relacionados con el sistema inmunitario, tales como el interferón (IFN) de tipo 1 (Boudinot *et al.*, 2016). Aunque algunos grupos de peces, tales como los salmónidos, presentan una duplicación adicional del genoma (Lien *et al.*, 2016), el rodaballo solo presenta la duplicación 3R propia de los actinopterigios (Figueras *et al.*, 2016).



Fig. 1. El rodaballo (*S. maximus*) es un pez plano que pertenece a la familia Scophthalmidae.

Tradicionalmente, el sistema inmunitario de los organismos acuáticos ha sido estudiado en mucha menor medida que el de los mamíferos. Sin embargo, actualmente existe un creciente interés en su estudio debido a varios motivos, tanto básicos como prácticos. Su estudio es importante para obtener un punto de vista comparado, lo cual es de interés para los biólogos evolucionistas. También resulta relevante descifrar como los mecanismos propios de estos organismos evolucionaron para resolver los problemas inmunitarios propios de los mismos (Lieschke y Trede, 2009). Otra razón es el auge de la acuicultura y la aparición de enfermedades que causan importantes pérdidas económicas en el sector. En este contexto, es necesario

conocer el sistema inmunitario de los organismos en cultivo para poder combatir las enfermedades de una forma eficaz.

2. Alimentación humana y acuicultura

Existen indicios de que el ser humano (*Homo sapiens*) se alimentaba de pescado ya durante el Paleolítico Superior en Europa. Se ha documentado la presencia de proteína de origen acuático (peces, moluscos y/o aves) en los esqueletos de *H. sapiens* (Richards *et al.*, 2001). Además, en el norte de España, se han encontrado, en asentamientos humanos, restos de salmónidos y otros peces, así como pinturas en las que se representaba a estos organismos (Adán *et al.*, 2009). La pesca consiste en la captura y extracción de animales salvajes del ambiente acuático. Es importante reseñar que, de forma análoga a lo que ocurre con la caza, la pesca, en general, no es sostenible a escala industrial (Pauly *et al.*, 2002). Por esto, la acuicultura se perfila como la opción más conveniente para obtener proteína de origen acuático, ya sea marino o continental, reduciendo la presión a la que se ven sometidas las poblaciones naturales. La acuicultura es el cultivo de organismos acuáticos, incluidos peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas. El cultivo implica alguna forma de intervención en el proceso de crianza para mejorar la producción, como el almacenamiento regular, la alimentación, la protección contra los depredadores, etc. También implica la propiedad individual o corporativa de la población que se cultiva. Para fines

estadísticos, los organismos acuáticos que son cosechados por un individuo o entidad corporativa que los ha poseído durante su período de crianza contribuyen a la acuicultura, mientras que los organismos acuáticos que son explotados por el público como recursos de propiedad común, con o sin licencias apropiadas, son la cosecha de la pesca según la FAO.

En el año 2016, la producción pesquera total, es decir, la pesca extractiva y la acuicultura, fue de 171 millones de toneladas, de las que la acuicultura representó un 47% de la producción pesquera total para uso alimentario (FAO, 2018). Si los datos de la producción acuícola se desgranán en producción marina y producción continental, la primera fue de 28,7 millones de toneladas, mientras que la segunda fue de 51,4 millones de toneladas durante el año 2016 (FAO, 2018) (Fig. 2).

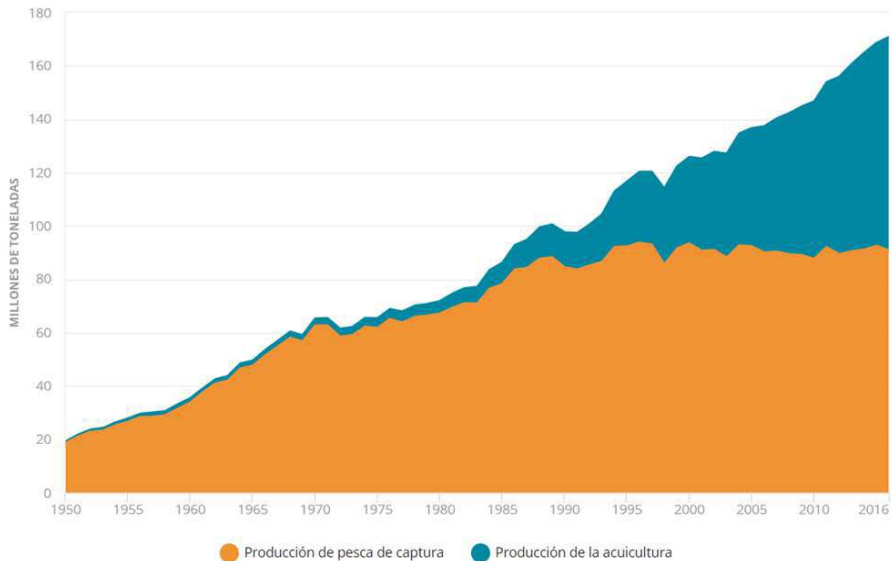


Fig. 2. Producción mundial de la pesca y la acuicultura desde 1950 hasta 2016. Se excluyen los mamíferos acuáticos, cocodrilos, lagartos y caimanes, las algas y otras plantas acuáticas (FAO, 2018).

S. maximus es una especie de gran importancia en la acuicultura, principalmente cultivada en el Noroeste de España (Comunidad Autónoma de Galicia) y China. En Europa, Galicia es la principal productora de rodaballo, llegando a cuotas del 99% de la producción total española (8546 toneladas) en el año 2017 (APROMAR, 2018).

Una de las limitaciones más importantes de la acuicultura a nivel ambiental es su poca sostenibilidad. En el modelo actual, los peces carnívoros se alimentan con otros peces de menor valor comercial de los que obtienen micronutrientes y ácidos grasos

esenciales, por lo que la presión sobre la biomasa salvaje no se reduce, pudiendo llegar a colapsar en el futuro (Pauly *et al.*, 2002; Froehlich *et al.*, 2018). Otro importante problema, a nivel técnico en este caso, es la aparición de enfermedades infecciosas. En el rodaballo en cultivo se han descrito brotes de enfermedades bacterianas (Toranzo *et al.*, 2005), víricas (Walker y Winton 2010) y parasitarias (Álvarez-Pellitero *et al.*, 2008; Piazzon *et al.*, 2013), las cuales han causado importantes mortalidades y cuantiosas pérdidas económicas. Este hecho ha provocado un incremento del esfuerzo dedicado al conocimiento y a la potencial manipulación del sistema inmunitario de esta especie, así como a su interacción con los patógenos. La finalidad de estas investigaciones es el desarrollo de herramientas de prevención y control, tales como vacunas, inmunoestimulantes y agentes quimioterápicos. Así, el creciente número de trabajos de investigación publicados en el área de la inmunología de peces en general y rodaballo en particular, no se explicaría sin el auge de la acuicultura de los mismos y la aparición de enfermedades emergentes.

Según Snieszko (1974), las enfermedades infecciosas se producen cuando un hospedador susceptible entra en contacto con un patógeno virulento en unas condiciones ambientales apropiadas, influidas por la temperatura; la deficiencia o exceso de nitrógeno y oxígeno; y la eutrofización o la presencia de aguas residuales, productos del metabolismo de los propios peces, contaminación industrial o pesticidas (Fig. 3).

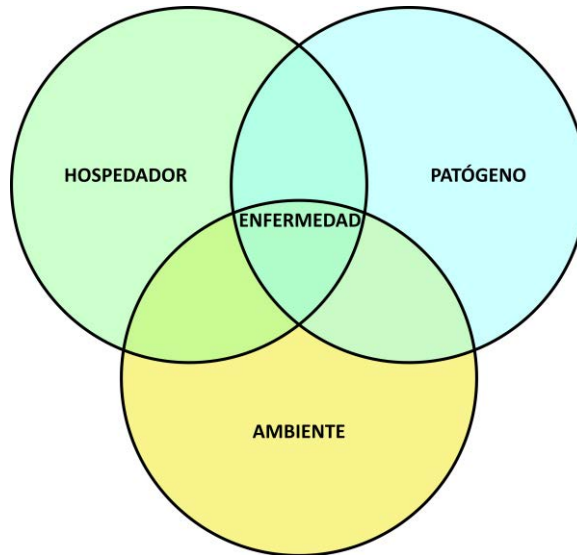


Fig. 3. El diagrama de Venn muestra las interacciones necesarias para que una enfermedad se produzca. Adaptado de Snieszko (1974).

Hay varias razones que explican la alta incidencia de enfermedades infecciosas en los organismos acuáticos en cultivo. Así, factores como la alta densidad de los organismos y la no coevolución de los patógenos locales y los peces importados e introducidos en los cultivos, hacen que algunos microorganismos presentes en el agua no patógenos para peces salvajes se conviertan en patógenos para los peces en cultivo (Lafferty *et al.*, 2015).

3. Enfermedades parasitarias en el rodaballo

Las principales enfermedades infecciosas parasitarias, causadas por organismos microscópicos, y su agente causal que afectan al rodaballo son microesporidiosis (*Tetramicra brevifilum*)

(Lom y Dyková, 1992), amebiasis branquial (*Paramoeba sp.*) (Dyková *et al.*, 1998), escuticociliatosis (*Philasterides dicentrarchi*) (Iglesias *et al.*, 2001) y enteromixosis (*Enteromyxum scophthalmi*) (Palenzuela *et al.*, 2002).

3.1. *Philasterides dicentrarchi*

La escuticociliatosis es una enfermedad cuyos agentes causales son protozoos escuticociliados (Ciliophora) de los géneros, *Philasterides*, *Miamiensis*, *Pseudocohnilembus* y *Uronema* (Piazzon *et al.*, 2013). En rodaballos, esta enfermedad está provocada por *P. dicentrarchi* (Fig. 4), un ciliado marino de vida libre que se alimenta de materia orgánica en suspensión; pero que, bajo ciertas condiciones, puede actuar como un endoparásito histiófago, causando importantes mortalidades en plantas de producción acuícola (Dyková y Figueras, 1994; Iglesias *et al.*, 2001; Álvarez-Pellitero *et al.*, 2004). Se han descrito brotes de escuticociliatosis en varias especies de peces, como la lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Dragesco *et al.* 1995), el rodaballo (Iglesias *et al.*, 2001; Ramos *et al.*, 2007), el lenguado fino (*Paralichthys adspersus*) (De Felipe *et al.*, 2017), el fletán *Paralichthys olivaceus* (Yoshinaga y Nakazoe, 1993; Kim *et al.*, 2004; Harikrishnan *et al.*, 2012), el caballito de mar (*Hippocampus abdominalis*) (Di Cicco *et al.*, 2013), el dragón de mar (*Phyllopteryis taeniolatus*) (Umehara *et al.*, 2003) el tiburón cebra (*Stegostoma fasciatum*) (Li *et al.*, 2017a). *P. dicentrarchi* es un parásito muy

virulento que penetra por el torrente sanguíneo hasta alcanzar varios órganos (dermis, musculatura, branquias, hígado, tubo digestivo, bazo, riñón, corazón y sistema nervioso central) y acaba provocando normalmente la muerte del hospedador. Los síntomas de la enfermedad son ulceraciones cutáneas hemorrágicas, oscurecimiento de la piel y de las branquias, alteración de la natación, exoftalmia unilateral o bilateral, podredumbre de las aletas y la cola y distensión abdominal (Dyková y Figueras, 1994; Iglesias *et al.*, 2001).

Infecciones experimentales por inmersión en *S. maximus* y *P. olivaceus* han sugerido que la vía natural de infección podría ser a través de lesiones en piel o branquias, por las que entra el ciliado (Paramá *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2009). La sangre y el suero de rodaballo tienen un potente efecto quimiotrayente para *P. dicentrarchi*, por lo que cualquier microabrasión podría convertirse en una diana por la que penetra el ciliado en el pez (Paramá *et al.*, 2004).

Uno de los mecanismos más importantes mediante el cual el parásito ataca al pez es la liberación de proteasas, que destruyen varias proteínas involucradas en la defensa contra el parásito, entre las que destacan las proteínas del sistema del complemento o los anticuerpos (Piazzon *et al.*, 2011). También se ha sugerido que estas pueden inducir la apoptosis de los leucocitos del riñón anterior del pez (Paramá *et al.*, 2007). En cuanto a los mecanismos de defensa del pez, la respuesta inmunitaria celular del rodaballo tiene un papel secundario en la defensa frente al ciliado cuando se compara con el

sistema del complemento (Piazzon *et al.*, 2011), que protege al pez tanto por la vía alternativa (mediada por el complemento solamente) como por la clásica (mediada por anticuerpos específicos) (Leiro *et al.*, 2008; Piazzon *et al.*, 2011). El sistema de la coagulación también juega un papel importante en la defensa frente al ciliado, formando coágulos inducidos por el propio parásito que lo retienen y lisan (Blanco-Abad *et al.*, 2018).

La medida de prevención básica, como ocurre con los demás patógenos, pasa por mantener el ambiente del pez libre del ciliado (Snieszko, 1974). Como en muchos casos esto es complicado debido a la naturaleza del medio en el que viven los peces, es necesario el desarrollo de nuevas vacunas y agentes quimioterápicos. Aunque el baño con formalina es un método efectivo para eliminar al ciliado del ambiente, *P. dicentrarchi* no se ha podido eliminar de los peces cuando entra en ellos (Paramá *et al.*, 2003). Numerosos compuestos han demostrado su toxicidad *in vitro* (Iglesias *et al.*, 2002; Quintela *et al.*, 2003; Leiro *et al.*, 2004; Paramá *et al.*, 2004; Paramá *et al.*, 2005; Paramá *et al.*, 2007; Harikrishnan *et al.*, 2010; Mallo *et al.*, 2016; Mallo *et al.*, 2017), abriendo la puerta al empleo de algunos de ellos como quimioterápicos en el futuro. El mecanismo de acción de alguno de ellos ya ha sido dilucidado. Por ejemplo, la curcumina es un polifenol natural obtenido de la cúrcuma (*Curcuma longa*) que presenta una potente actividad antiparasiticida (Mallo *et al.*, 2017). Otras sustancias con actividad antiparasiticida frente al ciliado son los

compuestos antimaláricos cloroquina y artemisina, los cuales desregulan enzimas que intervienen en el metabolismo del calcio y la pirofosfatasa (Mallo *et al.*, 2016). A pesar de conocerse un elevado número de compuestos tóxicos para *P. dicentrarchi*, no existen datos sobre su utilización *in vivo*. A la luz de estos datos, la mejor forma de combatir la escuticociliatosis provocada por *P. dicentrarchi* sigue siendo la inmunización intraperitoneal del pez con alguna de las vacunas desarrolladas por nuestro grupo (Sanmartín *et al.*, 2008; Lamas *et al.*, 2008; León-Rodríguez *et al.*, 2012).

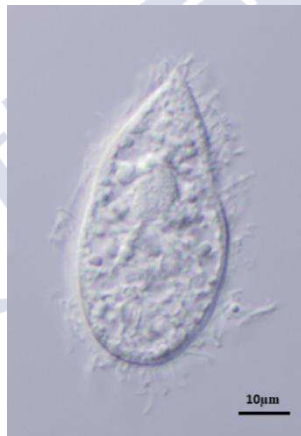


Fig. 4. Espécimen de *P. dicentrarchi* fijado con formalina. Microscopía de contraste interdifereencial de Nomarski.

4. Sistema inmunitario

La función del sistema inmunitario es dual, ya que, por una parte, protege a los organismos frente a virus, bacterias y parásitos y, por la otra, diferencia lo propio de lo extraño. Tradicionalmente, el sistema inmunitario se divide en innato y adquirido (Dempsey *et al.*,

2003; Akira *et al.*, 2006). Aunque los dos tipos de respuestas son evolutivamente independientes, están íntimamente ligadas, dependiendo generalmente el primero del segundo (Iwasaki y Medzhitov, 2015).

4.1. Sistema inmunitario innato

El sistema inmunitario innato es el primero en actuar, interaccionando con los componentes estructurales de los patógenos y protegiendo al organismo mediante un amplio abanico de receptores que reconocen dichos componentes y provocan una respuesta inmunitaria (Dempsey *et al.*, 2003). El sistema inmunitario innato está conformado por varios componentes que protegen al organismo frente a patógenos sin que medie un contacto previo con él.

El primer componente del sistema inmunitario innato son barreras físicas que impiden la entrada del patógeno en el organismo. Entre éstas se cuentan las escamas, el moco y la piel (Magnadóttir, 2006). El moco está formado por polisacáridos y, además de su propia función en la captura e inmovilización de los patógenos, posee moléculas tales como lectinas, pentraxinas, lisozima, proteínas del complemento, péptidos antimicrobianos, IgM e IgT (Magnadóttir, 2006; Salinas *et al.* 2015; Koshio, 2016; Brinchmann, 2016). El moco se produce y secreta constantemente en el pez, impidiendo de esta forma la colonización por microorganismos que podrían entrar en el organismo produciendo patologías (Ellis, 2001).

El componente celular del sistema innato está formado por monocitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células cebadas, *natural killer* (NK) y células citotóxicas naturales (Whyte, 2007; Fischer *et al.*, 2013). La presencia de eosinófilos y basófilos ha sido observada también en algunas especies de peces, pero su función es poco conocida.

Los monocitos son células presentes en el torrente sanguíneo que se diferencian en macrófagos cuando entran en un tejido. Sin embargo, mientras que los monocitos pueden penetrar en los tejidos y convertirse en macrófagos durante una respuesta inflamatoria, los macrófagos residentes parecen llegar a los tejidos en etapas embrionarias y luego son reemplazados por división de los macrófagos existentes (Yona *et al.*, 2013). Los macrófagos son células con una potente actividad fagocítica descritas por primera vez en 1882 por Élie Metchnikoff en estrella de mar, presentes potencialmente en todos los tejidos del organismo (Hodgkinson *et al.*, 2015). Estas células tienen un papel clave en la defensa y en el mantenimiento de la homeostasis. En base a las moléculas efectoras que actúan sobre ellos, se distinguen los macrófagos activados clásicamente o M1, cuya función es proinflamatoria y de defensa contra microorganismos, y los macrófagos activados alternativamente o M2, que constan de funciones antiinflamatorias y reguladoras (Hodgkinson *et al.*, 2015). En mamíferos, se distinguen los macrófagos M1, activados por interferón gamma ($IFN\gamma$) y factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$), los

cuales secretan diversas moléculas proinflamatorias como IL-1, IL-6, IL-12, IL-23 y TNF α (Forlenza *et al.*, 2011). Los macrófagos M1 de teleósteos poseen una elevada actividad fagocítica y microbicida. La actividad microbicida incluye numerosas enzimas y péptidos antimicrobianos, así como la liberación de radicales libres derivados de oxígeno y nitrógeno (Grayfer *et al.*, 2018). La producción de radicales libres comienza con la liberación del anión superóxido, que luego dará lugar a la formación de peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y ácido hipocloroso. Los macrófagos de peces también producen óxido nítrico tras la activación de la óxido nítrico sintasa. Aunque en mamíferos esta enzima se activa tras la estimulación con IFN γ , la estimulación con esta citocina no siempre va acompañada de la producción de óxido nítrico en peces (Grayfer *et al.*, 2018).

Los macrófagos M2 se dividen en M2a, que son estimulados por interleucina 4 (IL-4) y/o interleucina 13 (IL-13); M2b, polarizados por inmunocomplejos (IC) o células apoptóticas; y M2c, estimulados por el factor de crecimiento transformante beta (TGF β) y/o glucocorticoide (Grayfer *et al.*, 2018). En peces, también se han referido numerosos casos de polarización M1 y M2 en macrófagos (Wiegertjes *et al.*, 2016). Por ejemplo, estudios recientes han determinado que la proteína LEAP-2 o el microARN-155, provocan una polarización hacia macrófagos tipo M1 (Chen *et al.*, 2019; Nie *et al.*, 2019). Además, las proteínas similares a CXCL9–11 son capaces de polarizar una respuesta M1 y M2, a través de los receptores de

quimiocina PaCXCR3.1 y PaCXCR3, respectivamente (Lu *et al.*, 2017). Otro ejemplo de polarización tipo M2 es la que ocurre en macrófagos de dorada (*Sparus aurata*) en respuesta a la prostaglandina E2 (Montero *et al.*, 2016).

Los neutrófilos son las células del sistema inmunitario innato que primero llegan a los sitios de infección, donde liberan una gran variedad de componentes, tales como oxidantes tóxicos, enzimas, proteínas quelantes de metales y proteínas o péptidos catiónicos antimicrobianos (Allen y Criss, 2019). Asimismo, los neutrófilos poseen una importante actividad fagocítica (Lamas *et al.*, 1994; Folgueira *et al.*, 2015). Esta fagocitosis ocurre, o bien dependiente de opsonización por el complemento y/o inmunoglobulinas, o bien independiente de opsonización (Allen y Criss, 2019). La principal población de neutrófilos en peces se encuentra en el riñón y estas células pueden ser rápidamente movilizadas al sitio de la infección (Havixbeck *et al.*, 2016). La migración de los neutrófilos del torrente sanguíneo al sitio de inflamación ocurre mediada por la quimiocina CXCL8, también denominada interleucina 8 (IL-8), que ha sido identificada en varias especies de peces (Havixbeck y Barreda, 2015). Al igual que los neutrófilos de mamíferos, los neutrófilos de peces son capaces de generar trampas extracelulares (Palic *et al.*, 2007). Aunque estas células desempeñan un papel importante en la respuesta inflamatoria, sus capacidades reguladoras de esta actividad son poco conocidas en peces.

Las células dendríticas son células presentadoras de antígeno profesionales que conectan la inmunidad innata y la adquirida, que resultan clave durante las infecciones, capturando y presentando antígenos en el contexto de MHCI o MHCII a células T para iniciar una respuesta inmunitaria adaptativa (Mellman y Steinman, 2001). En peces, las células dendríticas no han sido muy estudiadas debido a la falta de anticuerpos específicos. Estas células identificaron inicialmente en salmónidos mediante un anticuerpo anti-langerina, el cual reconoce a una molécula presente en células de Langerhans, relacionada con el desarrollo de gránulos de Birbeck en humanos y ratones (Lovy *et al.*, 2009). Bassity y Clark (2012) identificaron células dendríticas en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) adaptando un protocolo para generarlas en mamíferos. Estas células MHCII⁺ mostraron características compartidas con las células dendríticas de mamíferos, tales como la morfología, marcadores moleculares (CD83, CD209), la capacidad de fagocitar pequeñas partículas, ser activadas por ligandos de receptores tipo Toll (TLRs) o su habilidad de migrar *in vivo*. Existe una población de células dendríticas CD8⁺ en ratones que durante infecciones con patógenos intracelulares tiene un papel muy relevante en la presentación del antígeno, propiciando respuestas de células T CD8⁺ (Shortman y Heath, 2010). Estudios recientes han identificado poblaciones de células CD8α⁺ MHCII⁺ que presentan antígeno a células T y que se expresan en piel, branquias e intestino de trucha arcoíris, las cuales se

ha sugerido que pueden ser antecesoras comunes a las células dendríticas presentadoras de antígeno de mamíferos, debido a que comparten numerosos marcadores moleculares con ellas (Granja *et al.*, 2015; Soletto *et al.*, 2018; Soletto *et al.*, 2019).

Las células NK son células del sistema inmunitario innato con actividad antiviral, que se lleva a cabo mediante la destrucción de células infectadas directamente o, indirectamente, mediante la producción de IFN γ , una citocina relacionada con respuestas antivirales (Abel *et al.*, 2018). En peces, se describieron inicialmente en pez gato americano como células citotóxicas no específicas que expresaban en su membrana una molécula similar a vimentina (Jaso-Friedmann *et al.*, 1993). Hogan *et al.* (1996) determinaron que las células NK de esta especie pueden lisar células infectadas por virus o células alogénicas. Las células NK eliminan otras células mediante dos mecanismos: la exocitosis de gránulos y mediante interacción FasL/Fas. Estos gránulos comprenden perforinas, granulinas y NK-lisinas que producen poros en las células y permiten la entrada de granzimas, las cuales producen apoptosis (Fischer *et al.*, 2013). Las NK-lisinas han sido descritas en varias especies (Zhou *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018; Ding *et al.*, 2019), incluido el rodaballo, donde se ha visto que esta molécula tiene una actividad antiparasitica en *P. dicentrarchi*, posiblemente a causa de la disrupción de la membrana del ciliado (Lama *et al.*, 2018).

Las células cebadas, también conocidas en peces como células granulares eosinófilas, se relacionan en mamíferos con reacciones inflamatorias y, particularmente, con reacciones alérgicas. Estas células contienen gránulos de fosfatasa alcalina y ácida; arilsulfatasa; 5-nucleotidasa; lisozima; peroxidasa; metencefalina; serotonina; histamina y péptidos antimicrobianos tales como piscidinas y pleuronectina. Las células cebadas, principalmente durante infecciones parasitarias, migran rápidamente a los sitios de infección y liberan el contenido de sus gránulos (Sfacteria *et al.*, 2015). En peces son muy abundantes en branquias, intestino y piel (Gómez *et al.*, 2013). La histamina es un mediador con importantes implicaciones en la inflamación, reacciones alérgicas, proliferación celular y hematopoyesis, entre otras (Branco *et al.*, 2018). Aunque estudios iniciales mostraron que las células cebadas de anfibios y peces carecían de histamina (Reite, 1965) y que la inyección intravascular de histamina no producía respuesta (Reite, 1972), estudios recientes en Perciformes demuestran que los peces de este orden sí la poseen, sugiriendo que podría ser una adquisición independiente reciente de este grupo, ya que los reptiles sí muestran células cebadas con histamina (Mulero *et al.*, 2007).

4.2. Sistema inmunitario adquirido

El sistema inmunitario adquirido está basado en células especializadas (linfocitos) que portan receptores para un único

antígeno. Los linfocitos aparecen ya en agnatos o peces no mandibulados, cuyos representantes actuales son las lampreas y los mixinos, y presentan en estos grupos un sistema basado en receptores denominados receptores variables de linfocitos (VLR) (Kasahara *et al.*, 2015). Existen tres tipos de receptores variables de linfocitos, los cuales se expresan diferencialmente en dos líneas de células equivalentes a linfocitos T y una línea equivalente a linfocitos B (Boehm *et al.*, 2018). En los peces mandibulados existe un sistema inmunitario adquirido caracterizado por la presencia linfocitos T y B, receptores TCR, moléculas de histocompatibilidad (MHC), inmunoglobulinas, selección clonal de células B y T, recombinación de segmentos V(D)J o incluso deaminasa de citosina inducida por activación; pero no cambio de isotipo de inmunoglobulina (Boehm *et al.*, 2018).

La función principal de las células B, también conocidas como linfocitos B, es producir el componente humoral de la inmunidad adaptativa, formado por anticuerpos o inmunoglobulinas. Estas células portan un receptor denominado receptor de células B (BCR) que controla su activación. Cuando, a través de su BCR, una célula B se encuentra con su antígeno específico ocurren dos eventos interrelacionados: por una parte, se dan cambios a nivel estructural, metabólico y de expresión génica y, por la otra, se internaliza y procesa el antígeno para ser presentado como péptidos a células T colaboradoras (Th, *T helper*) específicas para antígeno por medio del

MHC de clase II. Sin embargo, la activación completa de las células B, esto es, proliferación y diferenciación en células plasmáticas productoras de anticuerpos, requiere, o bien la interacción con una célula T colaboradora específica para antígeno a través del receptor coestimulador CD40 y su ligando CD40L, o bien la interacción con receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), lo cual lleva a una activación no dependiente de células T (Cerutti *et al.*, 2012; Kwak *et al.*, 2019).

En peces óseos se han descrito cuatro poblaciones de células B en base a las inmunoglobulinas que expresan en su superficie. Se distingue una población de células IgM^+IgD^+ , otra de células IgM^-IgD^+ , otra de células IgM^+IgD^- y una última de células IgT^+ (Edholm *et al.*, 2010; Parra *et al.*, 2016; Abós *et al.*, 2018). En el bazo y riñón principalmente, se encuentra la población de células B IgM^+ , que es la más abundante y presenta características similares a las células B1 de mamíferos (Abós *et al.*, 2016; Parra *et al.*, 2016; Abós *et al.*, 2018). Estas células presentan una elevada capacidad fagocítica, así como la habilidad de destruir patógenos intracelularmente (Li *et al.*, 2006).

Las células B que expresan IgD se han encontrado en las branquias de trucha (Castro *et al.*, 2014a), sangre de pez gato (*Ictalurus punctatus*) (Edholm *et al.*, 2010) o riñón de trucha arcoíris (Abós *et al.*, 2018). La población de células IgT^+ ha sido descrita inicialmente en trucha arcoíris y se han identificado en intestino (Zhang *et al.*, 2010) o mucosa nasal (Yu *et al.*, 2018), sugiriendo una

especialización de estas células en la inmunidad de las mucosas (Zhang *et al.*, 2010; Parra *et al.*, 2016). Sin embargo, estas células también se han identificado órganos no relacionados con las mucosas, como riñón anterior de trucha arcoíris (Abós *et al.*, 2018). Al igual que en el caso de las células IgM⁺ (Li *et al.*, 2006), las células IgT⁺ presentan la capacidad de fagocitar en una medida similar a estas, además de presentar igualmente la habilidad de destruir las bacterias fagocitadas intracelularmente (Zhang *et al.*, 2010).

Las células T poseen un receptor de células T (TCR) cuya función es el reconocimiento de antígenos presentados por MHC. Este TCR es un heterodímero que, en mamíferos, presenta dos formas en función de las subunidades que lo conforman, distinguiéndose células T circulantes con un heterodímero con las subunidades α y β y células T asociadas a mucosas, cuyo TCR está formado por las subunidades γ y δ . Según su función, las células T se dividen en células T citotóxicas (CTLs) y células T colaboradoras. Las CTLs expresan el marcador CD8, que interacciona con las MHC de clase I, mientras que las células colaboradoras expresan el CD4, el cual interacciona con las MHC de clase II (Nakanishi *et al.*, 2015). En peces, al igual que en mamíferos, las células T CD8⁺ tienen una función importante combatiendo las enfermedades víricas mediante la eliminación de células infectadas, encontrándose respuestas específicas frente a ellos en varias especies de peces (revisado en Somamoto *et al.*, 2014). Las células Th se dividen en Th1, Th2 y Th17. Las respuestas mediadas

por células Th1 se caracterizan por la activación de CTLs y las Th2, por la activación de células B y la producción de anticuerpos, mientras que las Th17 tienen funciones en las enfermedades autoinmunes y en la migración de neutrófilos (Fischer *et al.*, 2013).

Las inmunoglobulinas (Igs) o anticuerpos, descubiertas por von Behring y Kitasato en 1890, son, desde un punto de vista estructural, proteínas heterodiméricas unidas por puentes disulfuro y formadas por dos cadenas pesadas (H, *heavy*) y dos cadenas ligeras (L, *light*) de ~55 KDa y ~25 KDa cada una, respectivamente. Las Igs tienen dos dominios bien diferenciados en base a la función que realizan: un dominio variable, que se une al antígeno de forma específica, y un dominio constante, que activa al complemento o se une a receptores de Fc (Schroeder y Cavacini, 2010).

En mamíferos se han descrito cinco isotipos de inmunoglobulinas (IgM, IgD, IgG, IgA, e IgE), cada una de ellas con una función determinada. En peces óseos, aunque de las anteriormente mencionadas solo se han descrito la IgM y la IgD, se ha identificado una inmunoglobulina adicional exclusiva, denominada IgZ en pez cebra e IgT en varias especies de teleósteos, relacionada con la inmunidad de mucosas (Zhang *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2010).

La IgM está relacionada con la protección sistémica, aunque también puede aparecer en moco (Mashoof y Criscitiello, 2016). A diferencia de lo que ocurre en mamíferos, donde su estructura es pentamérica, en peces óseos esta es tetramérica, aunque en los dos

grupos de organismos aparece una forma monomérica transmembrana que sirve como receptor de antígeno (Flajnik y Kasahara, 2010). Esta inmunoglobulina aparece temprano en la evolución, siendo identificada ya en peces cartilagosos (Marchalonis y Edelman, 1966). La IgM es la inmunoglobulina más abundante en el suero de peces (Zhang *et al.*, 2010; Mashoof y Criscitiello, 2016) y sus formas, secretada y de membrana, han sido descritas en numerosos peces óseos, entre los que se encuentra el rodaballo, en la que ha sido caracterizada a nivel genético (Gao *et al.*, 2014).

La IgT es una inmunoglobulina que, aunque se ha venido relacionando con la inmunidad de mucosas (Zhang *et al.*, 2010; Tacchi *et al.*, 2014), algunos estudios recientes dejan ver que tiene también una función no relacionada con éstas (Castro *et al.* 2013; Castro *et al.*, 2014b; Abós *et al.*, 2018). La IgT no está filogenéticamente relacionada con la IgA de mamíferos o la IgX de anfibios, aunque las tres cumplen una función análoga (Zhang *et al.*, 2010). La IgT aparece como monómero en el suero y como tetrámero en el moco, si bien la unión de sus monómeros no es covalente, como sí lo es en el caso de la IgM (Zhang *et al.*, 2010). Debido a la importancia de la inmunidad de mucosas, esta inmunoglobulina ha recibido mucha atención en los últimos años, siendo identificada en varias especies de teleósteos, como el espinoso (*Gasterosteus aculeatus*) (Gambón-Deza *et al.*, 2010), salmón atlántico (*Salmo salar*) (Tadiso *et al.*, 2011), catla (*Catla catla*) (Patel *et al.*, 2016),

lubina (*D. labrax*) (Buonocore *et al.*, 2017), tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Velázquez *et al.*, 2018) o rodaballo (*S. maximus*) (Tang *et al.*, 2018). Hasta ahora se han descrito tres subclases de IgT en trucha arcoíris, denominadas IgT1, IgT2 e IgT3 con patrones de expresión distintos (Zhang *et al.*, 2017).

La IgD es una inmunoglobulina identificada en varios grupos de vertebrados, incluidos peces mandibulados, de cuya función se sabe poco. Su estructura es muy variable entre grupos de vertebrados (Chen y Cerutti, 2011) e incluso entre peces (Mashoof y Criscitello, 2016) y aparece en forma secretada (Bengtén *et al.*, 2002). Las células B de peces parecen perder la expresión de IgD cuando se diferencian a plasmablastos o células plasmáticas, de forma análoga a lo observado en mamíferos (Tafalla *et al.*, 2017). Se ha encontrado expresión de esta inmunoglobulina en riñón anterior, bazo, sangre, branquia, piel o intestino (Basu *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). En el pez gato americano se ha identificado una forma secretada de esta inmunoglobulina que carece de la región variable y se ha sugerido que podría actuar como un PRR (Edholm *et al.*, 2010). En cuanto a su regulación, se ha observado un aumento de expresión de esta inmunoglobulina en mucosas en respuesta a inmunizaciones (Makesh *et al.*, 2015) o en zonas ulcerativas en infecciones experimentales con *Flavobacterium psychrophilum* en trucha (Muñoz-Atienza *et al.*, 2019a). La regulación de la IgD también ha sido constatada a nivel de proteína, observándose un aumento de la IgD en riñón anterior de

truchas infectadas con el endoparásito *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Abós *et al.*, 2018).

4.3. Relación entre el sistema inmunitario innato y el adquirido

Los sistemas inmunitarios innato y adquirido no funcionan de forma aislada, sino que están fuertemente interrelacionados. El control del sistema inmunitario adaptativo por el innato fue establecido por Charles Janeway Jr. en 1989. Los microorganismos expresan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), que son estructuras moleculares conservadas, tales como polisacáridos complejos, glicolípidos, lipoproteínas, nucleótidos o ácidos nucleicos. El sistema inmunitario innato posee receptores de reconocimiento de patrón (PRRs), los cuales pueden unirse a los PAMPs presentes en los microorganismos. La diversidad de los PRRs es grande y se pueden clasificar en TLRs (receptores tipo Toll), NLRs (receptores tipo Nod), receptores con repeticiones ricas en leucina, RLRs (receptores tipo RIG-I), CLR (receptores de lectina de tipo C) y ALRs (receptores tipo AIM2). También se incluye una familia de enzimas que actúan como sensores intracelulares para ácidos nucleicos (Iwasaki y Medzhitov, 2015). Muchos de estos receptores están muy conservados durante la evolución y en peces se han descrito los mismos tipos de PRRs que en mamíferos. Li *et al.* (2017b) hacen una revisión sobre los PRRs presentes en pez cebra (*Danio rerio*), poniendo de manifiesto

que la casi totalidad de los receptores descubiertos en mamíferos existen también en peces y, además, se han descrito receptores en peces que no aparecen en mamíferos. En rodaballo, por ejemplo, se ha identificado el TLR5, que reconoce la flagelina (Liu *et al.*, 2018); el TLR21, que reconoce ADN CpG no metilado y es un análogo funcional del TLR9 de mamíferos (Li *et al.*, 2017c); el TLR2, que reconoce sobre todo componentes de bacterias Gram positivas (Zhang *et al.*, 2016); el TLR3, que reconoce componentes de virus (Hu *et al.*, 2015a) y el TLR22, exclusivo de organismos acuáticos y que reconoce ARN de doble cadena (dsRNA, *double stranded RNA*) (Hu *et al.*, 2015b). También en rodaballo, se han secuenciado varios genes correspondientes a receptores tipo Nod (Hou *et al.*, 2017).

Los CLR_s son una superfamilia de proteínas que se caracterizan por presentar al menos un dominio de lectina tipo C (CTLD) y que reconocen un gran rango de ligandos. Estos receptores se expresan principalmente en células mieloides en las que funcionan como PRR_s, aunque también tienen otras funciones (Dambuzza y Brown, 2015). El receptor de manosa (MR) es un CLR con una importante función endocítica, pudiendo unirse a moléculas endógenas o a ligandos de microorganismos. Por ejemplo, se une a manosa y polisacáridos sulfatados, entre otros. Este receptor tiene una gran importancia en el sistema inmunitario, ya que es capaz de internalizar antígenos que serán presentados a través de las vías MHCII y CD1b (Martínez-Pomares, 2012). Esta habilidad ha hecho

del MR una interesante diana para el aumento de la inmunogenicidad y la elaboración de vacunas. Por esto, se han desarrollado vacunas en las que el antígeno se ha unido a manosa o a anticuerpos anti-manosa o en las que se han añadido polisacáridos sulfatados (Martínez-Pomares, 2012).

Las citocinas son pequeñas proteínas efectoras que intervienen en la señalización celular, participando en la comunicación entre las células del sistema inmunitario (Secombes *et al.*, 2011). Las citocinas controlan la división y diferenciación celular, así como la regulación de las células hematopoyéticas y de otras células que participan en la defensa del organismo, determinando la naturaleza de la respuesta inmunitaria. En peces se han identificado un elevado número de estas moléculas, las cuales habitualmente cuentan con varios genes parálogos (Zou y Secombes, 2016). La clasificación de las citocinas varía en función de los autores, los cuales pueden tener en cuenta aspectos como la estructura o la función. Dembic (2015) hace una división en interleucinas, citocinas para el desarrollo y crecimiento de las células del sistema inmunitario (TNF α/β , TGF- β , entre otras), interferones y quimiocinas. Se han descrito citocinas pertenecientes a todos esos grupos en peces (Alejo y Tafalla 2011; Secombes *et al.*, 2011; Zou y Secombes, 2011; Bird y Tafalla, 2015). Algunas de las interleucinas han sido ampliamente estudiadas en peces, entre las que se incluye la familia de la IL-1. La IL-1 β es una citocina proinflamatoria muy estudiada en peces, producida principalmente por

monocitos, macrófagos y células dendríticas relacionada con la infección y daños tisulares, que produce respuestas locales y sistémicas (Reis *et al.*, 2012). El papel de esta interleucina en las infecciones se ha determinado *in vivo* con la proteína recombinante. Por ejemplo, la inyección intraperitoneal de IL-1 β aumentó la supervivencia de la corvina japonesa (*L. crocea*) a la infección por *Vibrio alginolyticus* (Wu *et al.*, 2015). En la trucha, la inyección de IL-1 β en la cavidad peritoneal aumenta la resistencia a *A. salmonicida* y la actividad fagocítica de los leucocitos de la cavidad peritoneal (Peddie *et al.*, 2002). Además de interleucinas con actividad proinflamatoria, también se han descrito citocinas con actividad antiinflamatoria. Este es, por ejemplo, el caso de la IL-10, la cual posee actividad reguladora y antiinflamatoria demostrada en varios grupos de vertebrados, incluidos peces (Piazzon *et al.*, 2016). Se han encontrado varios genes de las familias del TNF y sus receptores en peces (Wiens y Glenney, 2011), siendo seguramente TNF α el más estudiado en estos organismos. El TNF α es una citocina pleiotrópica producida principalmente por macrófagos que causa la necrosis de células tumorales y apoptosis, aunque también está relacionado con la regulación del desarrollo embrionario, los ciclos circadianos y la defensa contra infecciones víricas y bacterianas (Chu, 2013). Los estudios realizados en peces indican que esta citocina posee funciones análogas a las descritas en mamíferos. El gen y la proteína han sido descritos en rodaballo (Ordás *et al.*, 2007), donde además de participar

en la activación de células inflamatorias, parece tener un papel regulador en los órganos hematopoyéticos (Ronza *et al.*, 2015).

Los interferones se agrupan en tres grupos en mamíferos, encontrándose dos de estos grupos en teleósteos (interferones de tipo I y de tipo II) (Robertsen, 2018). Los interferones de tipo I juegan un papel relevante en la respuesta frente a virus, la cual ha sido descrita en varios trabajos en rodaballo (Pereiro *et al.*, 2014; Pereiro *et al.*, 2016). El IFN γ es un interferón de tipo II que ha sido descrito en numerosas especies de peces, e incluso en alguna se han encontrado dos copias del gen (Pereiro *et al.*, 2019). Su papel como activador de macrófagos, una función que parece altamente conservada en vertebrados, ha sido también descrito en numerosos trabajos de investigación en peces. Otras citocinas relevantes en la respuesta inmunitaria son las quimiocinas, las cuales participan en la migración celular en condiciones fisiológicas normales o durante la inflamación. Se han descrito un elevado número de quimiocinas en peces y en muchos casos se han identificado la secuencia y estructura de los genes y, en algunos, se han realizado estudios funcionales (Alejo y Tafalla, 2011; Bird y Tafalla, 2015; Bhatt *et al.*, 2018). El análisis genético ha puesto en evidencia importantes diferencias entre la quimiocinas de peces y las de mamíferos, incluso entre especies de peces, siendo posible identificar homologías con mamíferos únicamente en algunas (Bird y Tafalla, 2015). Curiosamente, algunas

de esas citocinas, como la quimiocina 11, poseen actividad antimicrobiana (Muñoz-Atienza *et al.*, 2019b).

5. Vacunación

La vacunación es la mejor forma de prevenir las enfermedades infecciosas en acuicultura (Tafalla *et al.*, 2013; Munang'andu y Evensen, 2019). En teleósteos, no se desarrollaron vacunas hasta 1938, año en el que se publicó un estudio en el que se describió una vacuna contra la bacteria *Aeromonas punctata* en la carpa (*Cyprinus carpio*) (Snieszko *et al.*, 1938; Gudding y Van Muiswinkel, 2013). En este trabajo se demostró que la inyección de la bacteria inactivada otorgaba protección contra la infección. Curiosamente, los autores descartaron este método de inmunización a escala industrial, ya que consideraban que el método era demasiado costoso y laborioso (Snieszko *et al.*, 1938; Van Muiswinkel, 2008). Posteriormente, se desarrolló una vacuna oral a base de la bacteria patógena *A. salmonicida* inactivada con formalina que confirió protección a ejemplares de trucha arcoíris (Duff, 1942; Gudding y Van Muiswinkel, 2013). Aunque durante años no se puso demasiado énfasis en la prevención de las enfermedades de peces durante la vacunación debido a que las enfermedades conocidas, que eran principalmente bacterianas, podían ser controladas mediante antibióticos potentes y sulfamidas. Sin embargo, varios hechos, como la creciente preocupación por la salud pública, la aparición de cepas

resistentes y el auge de las enfermedades víricas, provocaron un aumento en el interés de la vacunación como forma de combatir las enfermedades (Van Muiswinkel, 2008). A partir de las dos últimas décadas del siglo XX, el diseño de vacunas para peces recibió un impulso importante, apareciendo numerosos trabajos que afrontaron enfermedades bacterianas (Toranzo *et al.*, 1995; Romalde y Magariños, 1997), víricas (Jones *et al.*, 1999; Yasumoto *et al.*, 2006) y, en mucha menor medida, parasitarias (Woo y Li, 1990; Sanmartin *et al.*, 2008; Lamas *et al.*, 2008). En el año 1976 se aprobó la primera vacuna comercial para peces, que confería protección contra la enfermedad de la boca roja entérica (Ellis, 1988), la cual afecta a varias especies de salmónidos y que está provocada por la bacteria Gram-negativa *Yersinia ruckeri* (Kumar *et al.*, 2015). Actualmente, existen veinticuatro vacunas comerciales disponibles para distintas especies de peces. La mayoría de ellas consisten en la administración intraperitoneal del patógeno entero inactivado, aunque también se encuentran disponibles vacunas de subunidades, proteínas recombinantes, ADN o atenuadas (Adams, 2019). Entre todas ellas, sin embargo, no existen aún vacunas comerciales disponibles para parásitos u hongos. En el caso concreto de *P. dicentrarchi*, el principal problema para el desarrollo de una vacuna comercial es la diversidad antigénica presente en las distintas cepas. Piazzon *et al.* (2008) demostraron que la vacunación con una de las cepas de *P.*

dicentrarchi no produce protección cruzada frente cepas de otro serotipo.

5.1. Tipo de vacunas según el tipo de antígeno

Según el tipo de antígeno empleado en la vacunación Munang'andu *et al.* (2016) distinguen dos sistemas: el sistema basado en antígenos que se replican y el basado en antígenos que no se replican. Entre las primeras, se distinguen las vacunas basadas en cepas atenuadas, vacunas basadas en ADN y vacunas basadas en vectores vivos heterólogos. Entre las vacunas basadas en antígenos no replicantes se distinguen las vacunas inactivadas, vacunas basadas en subunidades y vacunas basadas en productos extracelulares. Las vacunas inactivadas, a pesar de ser más seguras que las vivas atenuadas, necesitan la adición de un adyuvante para una adecuada protección a largo plazo (Brudeseth *et al.*, 2013) Las vacunas vivas atenuadas provocan una potente respuesta humoral y celular (Pulendran y Ahmed, 2011).

Existen vacunas efectivas para rodaballo basadas en organismos inactivados, como las que se emplean para prevenir la escuticociliatosis producida por *P. dicentrarchi* (Sanmartín *et al.*, 2008; Lamas *et al.*, 2008), la furunculosis producida por *A. salmonicida* (Santos *et al.*, 2005) o la edwardsiellosis provocada por *Edwardsiella tarda* (Castro *et al.*, 2008). En cuanto a vacunas de subunidades, se han empleado con eficacia también contra *P.*

dicentrarchi (León-Rodríguez *et al.*, 2012). Las vacunas de ADN se han empleado también con éxito para prevenir la septicemia hemorrágica viral en el rodaballo, mediante una inyección intramuscular de un plásmido que codificaba la glicoproteína G del virus (Pereiro *et al.*, 2012). También en rodaballo, se ha empleado una vacuna efectiva basada en cepas atenuadas de *Vibrio anguillarum* y *Edwardsiella piscicida* que fueron inoculadas simultáneamente, provocando un efecto sinérgico en la protección frente a los patógenos (Bao *et al.*, 2019).

5.2. Ruta de administración de las vacunas

En teleósteos, como en otros grupos de animales, las vacunas se pueden administrar por varias vías. Las más empleadas son las vacunas por inmersión o baño, intraperitoneales y orales.

La inyección consiste en la inoculación de la vacuna dentro de la cavidad peritoneal o en la musculatura del pez. Este es el método de vacunación que otorga una mayor protección, aunque aumenta el estrés al que se ve sometido el pez y no es adecuado para peces pequeños (Lillehaug, 2014).

La inmersión o baño es un método de vacunación en el que el antígeno se pone en contacto con las superficies mucosas del pez (branquias, piel y tubo digestivo). La vacuna se diluye en agua dulce o salada, dependiendo del pez, normalmente a una concentración 1:10 (v:v), y se sumerge en ella a los peces. Dependiendo del tiempo de

exposición, se habla de baño corto, que dura entre 30 y 60 segundos, o baño prolongado, cuando sobrepasa esa duración (Lillehaug, 2014). Este método de vacunación, además de ser especialmente adecuado para peces pequeños, los cuales son difíciles o directamente imposibles de inyectar, reduce considerablemente el estrés al que se ve sometido al pez con respecto a las vacunas inyectables (Lillehaug, 2014; Munang'andu *et al.*, 2015).

Las vacunas orales son las más adecuadas para reducir el estrés durante la vacunación. Al igual que las vacunas por baño o inmersión, estas estimulan el sistema inmunitario cuando el antígeno entra en contacto con las superficies mucosas del tubo digestivo (Lillehaug, 2014). Tanto las vacunas orales como las de inmersión o baño estimulan la inmunidad innata y adquirida en tubo digestivo, branquias, piel y mucosa nasal (Munang'andu *et al.*, 2015).

5.3. Adyuvantes

Los antígenos, muy frecuentemente, no son lo suficientemente inmunogénicos por sí mismos y necesitan la adición de una sustancia que potencia su efecto, la cual recibe el nombre de adyuvante. Una definición más actual de adyuvante es la de sustancia que es capaz de modular la respuesta inmune de un antígeno (ver revisión de Tafalla *et al.* 2013). Los primeros adyuvantes se emplearon ya en 1925 cuando Gaston Ramon descubrió que la coadministración de un toxoide de difteria y varios compuestos, tales como tapioca, lecitina, agar, aceite

de almidón, saponina o pan rallado aumentaba la respuesta inmunitaria frente a la difteria en relación a la administración del toxoide sin estas sustancias (Christensen, 2016). Un hito fundamental en el desarrollo de vacunas fue el descubrimiento de la capacidad de las sales de aluminio de aumentar la antigenicidad del toxoide de difteria, o lo que es lo mismo, de actuar como adyuvante (Glenny *et al.*, 1926). Dicho descubrimiento tuvo una importancia fundamental en la historia de las vacunas, ya que hasta 1990 fue el único adyuvante aprobado para su empleo en humanos. A partir de entonces, se aprobaron vacunas que emplean otros adyuvantes, tales como el adyuvante a base de emulsión de escualeno MF594, virosomas de influenza reconstituidos inmunopotenciadores (IRIV), hidróxido de aluminio con el inmunoestimulante monofosforil lípido A (MPL), una emulsión de escualeno que incluye el inmunoestimulante α -tocoferol AS03 o AS01E, un adyuvante liposómico que contiene MPL y saponina inmunoestimulante QS- 21 (Christensen, 2016).

Debido a la heterogeneidad de compuestos que pueden actuar como adyuvantes, su clasificación se realiza atendiendo a sus efectos y no a la naturaleza química o las características físicas del compuesto. Así, una clasificación, comúnmente aceptada es su división en adyuvantes facilitadores de señal de tipo 1 y adyuvantes facilitadores de señal de tipo 2. Los facilitadores de señal de tipo 1 son aquellos adyuvantes que influyen en el antígeno en tiempo, lugar y concentración, mejorando su disponibilidad. Los adyuvantes

facilitadores de señal de tipo 2 son aquellos que actúan emitiendo señales coestimuladoras durante el reconocimiento del antígeno, produciendo un ambiente adecuado para una respuesta específica adecuada (Tafalla *et al.*, 2013). En peces, los adyuvantes de tipo 1 se dividen en emulsiones basadas en aceites y en nano/micropartículas. Entre los adyuvantes oleosos destacan el adyuvante completo de Freund (FCA), el adyuvante incompleto de Freund (FIA) y algunos tipos de Montanide, aunque se emplean también otros en menor medida. El FCA, que está compuesto por *Mycobacterium tuberculosis* inactivado por calor y un aceite mineral que actúa como surfactante, no se emplea más que de modo experimental, ya que provoca muchos efectos adversos, tales como granulomas. El FIA se diferencia del FCA en que en el primero el *Mycobacterium tuberculosis* inactivado por calor se ha eliminado, con el objetivo de hacer el adyuvante menos agresivo. Aun así, y a pesar de que produce una buena respuesta a la vacunación, sigue provocando efectos adversos. El Montanide es un adyuvante oleoso formado por un aceite mineral, un aceite no mineral o una mezcla de ambos y un surfactante. La emulsión resultante puede ser de agua en aceite, aceite en agua o agua en aceite y en agua (Tafalla *et al.*, 2013). En rodaballo, por ejemplo, se emplea el adyuvante Montanide en vacunas intraperitoneales frente al parásito ciliado *P. dicentrarchi*, ya que aumenta de forma significativa la supervivencia en relación a la vacunación con antígeno completo inactivado sin adyuvante (Sanmartín *et al.*, 2008; Lamas *et*

al., 2008). Este adyuvante, aunque provoca una fuerte respuesta inmunitaria administrado por inyección, causa importantes daños en el pez, tales como adhesiones en los órganos internos o granulomas (Noia *et al.*, 2014; Galindo-Villegas *et al.*, 2019). Este adyuvante también se ha empleado en vacunas por inmersión. Por ejemplo, se vacunaron *P. olivaceus* con Montanide contra el virus de la septicemia hemorrágica, resultando en una protección superior a los peces vacunados sin adyuvante (Hwang *et al.*, 2017). Aunque este es un adyuvante muy empleado en varios grupos de vertebrados, mismo en tratamientos contra el cáncer en humanos (Bekaii-Saab *et al.*, 2019), su mecanismo de acción no está todavía lo suficientemente estudiado.

Los adyuvantes basados en nanoesferas o microesferas son una alternativa más segura a los oleosos, ya que no provocan los efectos adversos de estos. En rodaballo se han empleado con éxito vacunas frente a *P. dicentrarchi* basadas en en microsferas de los polímeros biodegradables quitosano o Gantrez® a las que se le unió covalentemente antígeno, que además de no provocar efectos adversos, no produjeron retraso en el crecimiento, como en el caso del FCA (León-Rodríguez *et al.*, 2012).

Entre los adyuvantes de tipo 2 se distinguen sales de aluminio, β -glucanos, saponinas, *Poly I:C*, lipopeptidos, flagelina, CpG o citocinas (Tafalla *et al.*, 2013). Las sales de aluminio, cuyo papel como adyuvante se conoce ya desde principios del siglo XX (Glenny *et al.*, 1926), son los adyuvantes más empleados en las vacunas

aprobadas para su uso en humanos. Concretamente, los compuestos hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio son los más habitualmente empleados en estas vacunas. Aunque en un principio las vacunas basadas en sales de aluminio se producían mediante precipitación del antígeno con compuestos de aluminio, debido a la poca reproducibilidad de este método, actualmente se lleva a cabo la adsorción del antígeno en geles de aluminio (HogenEsch *et al.*, 2018). Es destacable que, a pesar de haberse empleado durante décadas en vacunas, el mecanismo de acción del hidróxido de aluminio aún no se conoce completamente. Se cree que varios hechos, como son el efecto depósito en el sitio de inyección, el efecto citotóxico que produce en el sitio de inyección y que lleva al aumento de la inflamación y su capacidad para provocar la diferenciación de monocitos a células dendríticas explican la efectividad de este tipo de adyuvante (Marrack *et al.*, 2009).

En peces, se encuentra poca información disponible sobre el mecanismo de acción de las sales de aluminio. En la dorada, la liberación de patrones moleculares asociados a daños por células que sufren la actividad citotóxica tiene un importante papel en la mediación de la actividad del adyuvante (Angosto *et al.*, 2018). En peces se han desarrollado vacunas efectivas con este adyuvante. Por ejemplo, en el salmón atlántico (*S. salar*) una vacuna intramuscular contra *Flavobacterium psychrophilum* formulada con los adyuvantes escualeno e hidróxido de aluminio es efectiva sin diferencias

significativas con el adyuvante Montanide ISA 760VG, no mostrando además los cambios histopatológicos del adyuvante oleoso (Hoare *et al.*, 2019). Otro estudio muestra que una vacuna formulada también con escualeno e hidróxido de aluminio protege a *P. olivaceus* frente al virus de la septicemia hemorrágica viral, sin producir daños observables (Vinay *et al.*, 2013). Por otro lado, tanto el β -glucano, un polisacárido presente en las paredes de hongos, como el LPS, una molécula presente en la membrana externa de bacterias Gram negativas son capaces de aumentar varios parámetros del sistema inmunitario innato y adquirido, así como una elevada protección cuando se usan como adyuvantes en una vacuna intramuscular en relación a los peces inmunizados solo con *Escherichia coli* que expresa GADPH recombinante de *E. tarda* en el lenguado oliva (Diao *et al.*, 2013). La flagelina empleada como adyuvante en una vacuna inactivada también contra *Edwardsiella tarda* aumenta la efectividad de la vacuna en rodaballo (Liu *et al.*, 2017).

Aunque existen varias vacunas disponibles contra un amplio espectro de organismos, la información disponible acerca de su mecanismo de acción es muy limitado. De hecho, durante décadas, las vacunas se diseñaron de un modo empírico, replicando las vacunas de Louis Pasteur (S. XIX). Aunque la aparición de los adyuvantes supuso un impulso en la lucha contra las enfermedades infecciosas, el funcionamiento de los mismos, sin embargo, no ha sido lo suficientemente estudiado, aún en los adyuvantes más empleados en

vacunas para humanos, tales como los basados en aluminio. Solo en las últimas décadas se ha hecho un esfuerzo no solo en diseñar nuevos adyuvantes que potencien las vacunas tradicionales sin producir efectos adversos, sino también en el estudio de la respuesta inmunológica a nivel celular y molecular de los mismos. Comprender las bases inmunológicas por las que se rigen las respuestas de los organismos a las vacunas y adyuvantes es imprescindible para manipular el sistema inmunitario y diseñar nuevas vacunas que sean capaces de combatir de una forma efectiva las enfermedades infecciosas.

6. Bibliografía

- Aarnio, K., Bonsdorff, E. & Rosenback, N. (1996). Food and feeding habits of juvenile flounder *Platichthys flesus* (L.), and turbot *Scophthalmus maximus* (L.) in the Insländ Archipelago, northern Baltic Sea. *J. Sea Res.*, 36: 311-320.
- Abel, A.M., Yang, C., Thakar, M.S., Malarkannan, S. (2018). Natural killer cells: Development, maturation, and clinical utilization. *Front. Immunol.*, 9:1869. doi: 10.3389/fimmu.2018.01869
- Abós, B., Wang, T., Castro, R., Granja, A.G., Leal, E., Havixbeck, J., Luque, A., Barreda, D.R., Secombes, C.J., Tafalla, C. (2016). Distinct differentiation programs triggered by IL-6 and LPS in teleost IgM⁺ B cells in the absence of germinal centers. *Sci. Rep.*, 6. 30004. doi: 10.1038/srep30004

- Abós, B., Estensoro, I., Perdiguero, P., Faber, M., Hu, Y., Rosales, P.D., Granja, A.G., Secombes, C.J., Holland, J.W., Tafalla, C. (2018). Dysregulation of B cell activity during proliferative kidney disease in rainbow trout. *Front. Immunol.*, 9: 1203. doi: 10.3389/fimmu.2018.01203
- Adams, A. (2019). Progress, challenges and opportunities in fish vaccine development. *Fish Shellfish Immunol.*, 90: 210-214. doi: 10.1016/j.fsi.2019.04.066
- Adán, G.E., Álvarez-Lao, D., Turrero, P., Arbizu, M., García-Vázquez, E. (2009). Fish as diet resource in North Spain during the Upper Paleolithic. *J. Archaeol. Sci.*, 36: 895-899. doi: 10.1016/j.jas.2008.11.017
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4): 783-801. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.015
- Alejo, A., Tafalla, C. (2011). Chemokines in teleost fish species. *Dev. Comp. Immunol.*, 35: 1215-22. doi: 10.1016/j.dci.2011.03.011
- Allen, L.A.H., Criss, A.K. (2019). Cell intrinsic functions of neutrophils and their manipulation by pathogens. *Curr. Opin. Immunol.*, 60:124-129. doi: 10.1016/j.coi.2019.05.004
- Álvarez-Pellitero, P. (2008). Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 126: 171-98. doi: 10.1016/j.vetimm.2008.07.013

- Álvarez-Pellitero, P., Palenzuela, O., Padrós, F., Sitjà-Bobadilla, A., Riaza, A., Silva, R., Arán, J. (2004). Histophagous scuticociliatids (Ciliophora) parasitizing turbot *Scophthalmus maximus*: morphology, in vitro culture and virulence. *Folia Parasitol. (Praha)*, 51: 177–87. doi: 10.14411/fp.2004.021
- Angosto, D., López-Muñoz, A., García-Alcázar, A., Meseguer, J., Sepulcre, M.P., Mulero, V. (2018). Aluminum is a powerful adjuvant in teleost fish despite failing to induce interleukin-1 β release. *Dev. Comp. Immunol.*, 85: 18-24. doi: 10.1016/j.dci.2018.03.017
- APROMAR (2018). Informe anual de la Acuicultura en España por la Asociación Empresarial de Acuicultura de España
- Bailly, N., Chanet, B. (2010). *Scophthalmus* Rafinesque, 1810: The valid generic name for the turbot, *S. maximus* (Linnaeus, 1758) [Pleuronectiformes: Scophthalmidae]. *Cybium*, 34: 257-261.
- Bao, P., Sun, X., Liu, Q., Zhang, Y., Liu, X. (2019). Synergistic effect of a combined live *Vibrio anguillarum* and *Edwardsiella piscicida* vaccine in turbot. *Fish Shellfish Immunol.*, 88: 84-90. doi: 10.1016/j.fsi.2019.02.014
- Bassity, E., Clark, T.G. (2012). Functional identification of dendritic cells in the teleost model, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *PLoS One*, 7(3): e33196. doi: 10.1371/journal.pone.0033196
- Basu, M., Lenka, S.S., Paichha, M., Swain, B., Patel, B., Banerjee, R., Jayasankar, P., Das, S., Samanta, M. (2016). Immunoglobulin

- (Ig) D in *Labeo rohita* is widely expressed and differentially modulated in viral, bacterial and parasitic antigenic challenges. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 179: 77-84. doi: 10.1016/j.vetimm.2016.08.008
- Bekaii-Saab, T., Wesolowski, R., Ahn, D.H., Wu, C., Mortazavi, A., Lustberg, M., Ramaswamy, B., Fowler, J., Wei, L., Overholser, J., Kaumaya, P.T.P. (2019). Phase i immunotherapy trial with two chimeric HER-2 B-Cell peptide vaccines emulsified in montanide ISA 720VG and Nor-MDP adjuvant in patients with advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res.*, 25: 3495-3507. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-3997
- Bengtén, E., Quiniou, S.M.-A., Stuge, T.B., Katagiri, T., Miller, N.W., Clem, L.W., Warr, G.W., Wilson, M. (2002). The IgH locus of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*, contains multiple constant region gene sequences: different genes encode heavy chains of membrane and secreted IgD. *J. Immunol.*, 169: 2488-2497. doi: 10.4049/jimmunol.169.5.2488
- Bhatt, P., Kumaresan, V., Palanisamy, R., Ravichandran, G., Mala, K., Amin, S.M.N., Arshad, A., Yusoff, F.M., Arockiaraj, J. (2018). A mini review on immune role of chemokines and its receptors in snakehead murrel *Channa striatus*. *Fish Shellfish Immunol.*, 72:670-678. doi: 10.1016/j.fsi.2017.11.036
- Bird, S., Tafalla, C. (2015). Teleost chemokines and their receptors. *Biology (Basel)*, 4(4): 756-784. doi: 10.3390/biology4040756

- Blanco-Abad, V., Noia, M., Valle, A., Fontenla, F., Folgueira, I, De Felipe, A.P., Pereiro, P., Leiro, J, Lamas, J. (2018). The coagulation system helps control infection caused by the ciliate parasite *Philasterides dicentrarchi* in the turbot *Scophthalmus maximus* (L.). *Dev. Comp. Immunol.*, 87: 147-156. doi: 10.1016/j.dci.2018.06.001
- Boehm, T., Hirano, M., Holland, S.J., Das, S., Schorpp, M., Cooper, M.D. (2018). Evolution of alternative adaptive immune systems in vertebrates, *Annu. Rev. Immunol.*, 36:19-42. doi: 10.1146/annurev-immunol-042617-053028.
- Boudinot, P., Langevin, C., Secombes, C.J., Levraud, J.P. (2016). The peculiar characteristics of fish type I interferons. *Viruses*, 8(11). pii: E298. doi: 10.3390/v8110298
- Branco, A.C.C.C., Yoshikawa, F.S.Y., Pietrobon, A.J., Sato, M.N. (2018). Role of histamine in modulating the immune response and inflammation. *Mediators Inflamm.*, 2018: 9524075. doi: 10.1155/2018/9524075
- Brinchmann, M.F. (2016). Immune relevant molecules identified in the skin mucus of fish using -omics technologies. *Mol. Biosyst.*, 12: 2056-2063. doi: 10.1039/c5mb00890e
- Brudeseth, B.E., Wiulsrød, R., Fredriksen, B.N., Lindmo, K., Løkling, K.E., Bordevik, M., Steine, N., Klevan, A., Gravningen, K. (2013). Status and future perspectives of vaccines for

- industrialised fin-fish farming. *Fish Shellfish Immunol.*, 35(6):1759-1768. doi: 10.1016/j.fsi.2013.05.029
- Buonocore, F., Stocchi, V., Nunez-Ortiz, N., Randelli, E., Gerdol, M., Pallavicini, A., Facchiano, A., Bernini, C., Guerra, L., Scapigliati, G., Picchietti, S. (2017). Immunoglobulin T from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): Molecular characterization, tissue localization and expression after nodavirus infection. *BMC Mol. Biol.*, 18(1): 8. doi: 10.1186/s12867-017-0085-0
- Castro, N., Toranzo, A.E., Núñez, S., Magariños, B. (2008). Development of an effective *Edwardsiella tarda* vaccine for cultured turbot (*Scophthalmus maximus*), *Fish Shellfish Immunol.*, 25: 208-212. doi: 10.1016/j.fsi.2008.05.008.
- Castro, R., Abós, B., Pignatelli, J., Von Gersdorff Jørgensen, L., Granja, A.G., Buchmann, K., Tafalla, C. (2014b). Early immune responses in rainbow trout liver upon viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) infection. *PLoS One*, 9(10): e111084. doi: 10.1371/journal.pone.0111084
- Castro, R., Bromage, E., Abós, B., Pignatelli, J., González Granja, A., Luque, A., Tafalla, C. (2014a). CCR7 is mainly expressed in teleost gills, where it defines an IgD+IgM- B lymphocyte subset. *J. Immunol.*, 192: 1257-1266. doi: 10.4049/jimmunol.1302471
- Castro, R., Jouneau, L., Pham, H.P., Bouchez, O., Giudicelli, V., Lefranc, M.P., Quillet, E., Benmansour, A., Cazals, F., Six, A., Fi-

- llatreau, S., Sunyer, O., Boudinot, P. (2013). Teleost fish mount complex clonal IgM and IgT responses in spleen upon systemic viral infection. *PLoS Pathog.*, 9(1):e1003098. doi: 10.1371/journal.ppat.1003098
- Cerutti, A., Puga, I., Cols, M. (2012). New helping friends for B cells. *Eur. J. Immunol.*, 42(8):1956-1968. doi: 10.1002/eji.201242594
- Chen, J., Lv, Y.P., Dai, Q.M., Hu, Z.H., Liu, Z.M., Li, J.H. (2019). Host defense peptide LEAP-2 contributes to monocyte/macrophage polarization in barbel steed (*Hemibarbus labeo*). *Fish Shellfish Immunol.*, 87: 184-192. doi: 10.1016/j.fsi.2019.01.015
- Chen, K., Cerutti, A. (2011). The function and regulation of immunoglobulin D. *Curr. Opin. Immunol.*, 23(3): 345-352. doi: 10.1016/j.coi.2011.01.006
- Christensen, D. (2016). Vaccine adjuvants: Why and how. *Hum. Vaccines Immunother.*, 12(10): 2709-2711. doi: 10.1080/21645515.2016.1219003
- Chu, W.M. (2013). Tumor necrosis factor. *Cancer Lett.*, 328: 222-225. doi: 10.1016/j.canlet.2012.10.014
- Dambuza, I.M., Brown, G.D. (2015). C-type lectins in immunity: Recent developments. *Curr. Opin. Immunol.*, 2: 21-27. doi: 10.1016/j.coi.2014.12.002
- De Felipe, A.P., Lamas, J., Sueiro, R.A., Folgueira, I., Leiro, J.M. (2017). New data on flatfish scuticociliatosis reveal that

- Miamiensis avidus* and *Philasterides dicentrarchi* are different species. *Parasitology*, 144: 1394-1411. doi: 10.1017/S0031182017000749
- Dembic, Z. (2015). Introduction—Common features about cytokines. En: *Cytokines Immune System*. Elsevier, pp. 1-16. doi:10.1016/b978-0-12-419998-9.00001-8
- Dempsey, P.W., Vaidya, S.A., Cheng, G. (2003). The art of war: innate and adaptive immune responses. *Cell. Mol. Life Sci.*, 60(12): 2604-2621. doi: 10.1007/s00018-003-3180-y
- Di Cicco, E., Paradis, E., Stephen, C., Turba, M.E., Rossi, G. (2013). Scuticociliatid ciliate outbreak in Australian potbellied seahorse, *Hippocampus abdominalis* (Lesson, 1827): clinical signs, histopathologic findings, and treatment with metronidazole. *J. Zoo Wildl. Med.*, 44: 435-440. doi: 10.1638/2012-127R1.1
- Diao, J., Ye, H.B., Yu, X.Q., Fan, Y., Xu, L., Li, T.B., Wang, Y.Q. (2013). Adjuvant and immunostimulatory effects of LPS and β -glucan on immune response in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 156: 167-175. doi: 10.1016/j.vetimm.2013.10.004
- Ding, F.F., Li, C.H., Chen, J. (2019). Molecular characterization of the NK-lysin in a teleost fish, *Boleophthalmus pectinirostris*: Antimicrobial activity and immunomodulatory activity on monocytes/macrophages. *Fish Shellfish Immunol.*, 92: 256-264. doi: 10.1016/j.fsi.2019.06.021

- Dragesco, A., Dragesco, J., Coste, F., Gasc, C., Romestand, B., Raymond, J., Bouix, G. (1995). *Philasterides dicentrarchi*, n. sp. (Ciliophora, Scuticociliatida), a histophagous opportunistic parasite of *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758), a reared marine fish. Eur. J. Protistol., 31: 327-340. doi: 10.1016/S0932-4739(11)80097-0
- Duff, D.c.C.B. (1942). The oral immunization of trout against *Bacterium salmonicida*. J. Immunol., 44: 87-94.
- Dyková, I., Figueras, A. (1994). Histopathological changes in turbot *Scophthalmus maximus* due to a histophagous ciliate. Dis. Aquat. Organ., 18: 5-9. doi: 10.3354/dao018005
- Dyková, I., Figueras, A., Novoa, B., Casal, J.F. (1998). *Paramoeba* sp., an agent of amoebic gill disease of turbot *Scophthalmus maximus*. Dis. Aquat. Organ., 33: 137-141. doi: 10.3354/dao033137
- Edholm, E.-S., Bengtén, E., Stafford, J.L., Sahoo, M., Taylor, E.B., Miller, N.W., Wilson, M. (2010). Identification of two IgD+ B cell populations in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. J. Immunol., 185: 4082-4094. doi: 10.4049/jimmunol.1000631
- Ellis, A. (1988). Current aspects of fish vaccination. Dis. Aquat. Organ., 4: 159-164. doi: 10.3354/dao004159
- Ellis, A.E. (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. Dev. Comp. Immunol., 25: 827-839. doi: 10.1016/S0145-305X(01)00038-6

- FAO (2018). El estado mundial de la pesca y la acuicultura. En: <http://www.fao.org/state-of-fisheries-aquaculture/es/>
- Figueras, A., Robledo, D., Corvelo, A., Hermida, M., Pereiro, P., Rubiolo, J.A., Gómez-Garrido, J., Carreté, L., Bello, X., Gut, M., Gut, I.G., Marcet-Houben, M., Forn-Cuní, G., Galán, B., García, J.L., Abal-Fabeiro, J.L., Pardo, B.G., Taboada, X., Fernández, C., Vlasova, A., Hermoso-Pulido, A., Guigó, R., Álvarez-Dios, J.A., Gómez-Tato, A., Viñas, A., Maside, X., Gabaldón, T., Novoa, B., Bouza, C., Alioto, T., Martínez, P. (2016). Whole genome sequencing of turbot (*Scophthalmus maximus*; Pleuronectiformes): A fish adapted to demersal life. DNA Res., 23: 181-192. doi: 10.1093/dnares/dsw007
- Fischer, U., Koppang, E.O., Nakanishi, T. (2013). Teleost T and NK cell immunity. Fish Shellfish Immunol., 35(2): 197-206. doi: 10.1016/j.fsi.2013.04.018
- Flajnik, M.F., Kasahara, M. (2010). Origin and evolution of the adaptive immune system: Genetic events and selective pressures. Nat. Rev. Genet., 11(1): 47-59. doi: 10.1038/nrg2703
- Folgueira, I., Noia, M., Blanco-Abad, V., Mallo, N., Leiro, J., Lamas, J. (2015). Particle size and traffic of phagocytes between the turbot peritoneal cavity and lymphoid organs. Fish Shellfish Immunol., 44: 652-661. doi: 10.1016/j.fsi.2015.03.034

- Forlenza, M., Fink, I.R., Raes, G., Wiegertjes, G.F., 2011. Heterogeneity of macrophage activation in fish. *Dev. Comp. Immunol.*, 35(12):1246-55. doi: 10.1016/j.dci.2011.03.008
- Friedman, M. (2008). The evolutionary origin of flatfish asymmetry. *Nature*, 454: 209-212. doi: 10.1038/nature07108
- Froehlich, H.E., Jacobsen, N.S., Essington, T.E., Clavelle, T., Halpern, B.S. (2018). Avoiding the ecological limits of forage fish for fed aquaculture. *Nat. Sustain.*, 1: 298-303. doi: 10.1038/s41893-018-0077-1
- Galindo-Villegas, J., García-Alcazar, A., Meseguer, J., Mulero, V. (2019). Aluminum adjuvant potentiates gilthead seabream immune responses but induces toxicity in splenic melanomacrophage centers. *Fish Shellfish Immunol.*, 85: 31-43. doi: 10.1016/j.fsi.2018.02.047
- Gambón-Deza, F., Sánchez-Espinel, C., Magadán-Mompó, S. (2010). Presence of an unique IgT on the IGH locus in three-spined stickleback fish (*Gasterosteus aculeatus*) and the very recent generation of a repertoire of VH genes. *Dev. Comp. Immunol.*, 34: 114-122. doi: 10.1016/j.dci.2009.08.011
- Gao, Y., Yi, Y., Wu, H., Wang, Q., Qu, J., Zhang, Y. (2014). Molecular cloning and characterization of secretory and membrane-bound IgM of turbot. *Fish Shellfish Immunol.*, 40: 354-361. doi: 10.1016/

- Glenny, A.T., Pope, C.G., Waddington, H., Wallace, U. (1926). The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. *J. Pathol. Bacteriol.* 29: 38-39. doi: 10.1002/path.1700290106
- Gómez, D., Sunyer, J.O., Salinas, I. (2013). The mucosal immune system of fish: The evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. *Fish Shellfish Immunol.*, 35(6): 1729-1739. doi: 10.1016/j.fsi.2013.09.032
- Granja, A.G., Leal, E., Pignatelli, J., Castro, R., Abós, B., Kato, G., Fischer, U., Tafalla, C. (2015). Identification of teleost skin CD8 α ⁺ dendritic-like cells, representing a potential common ancestor for mammalian cross-presenting dendritic cells. *J. Immunol.*, 195: 1825-1837. doi: 10.4049/jimmunol.1500322
- Grayfer, L., Kerimoglu, B., Yaparla, A., Hodgkinson, J.W., Xie, J., Belosevic, M. (2018). Mechanisms of fish macrophage antimicrobial immunity. *Front. Immunol.*, 9: 1105. doi: 10.3389/fimmu.2018.01105
- Gudding, R., Van Muiswinkel, W.B. (2013). A history of fish vaccination: Science-based disease prevention in aquaculture. *Fish Shellfish Immunol.*, 35(6): 1683-1688. doi: 10.1016/j.fsi.2013.09.031
- Harikrishnan, R., Jin, C.N., Kim, J.S., Balasundaram, C., Heo, M.S. (2012). *Philasterides dicentrarchi*, a histophagous ciliate causing scuticociliatosis in olive flounder, *Philasterides*

- dicentrarchi*-Histopathology investigations. *Exp. Parasitol.*, 130: 239-245. doi: 10.1016/j.exppara.2011.12.007
- Harikrishnan, R., Jin, C.-N., Kim, M.-C., Kim, J.-S., Balasundaram, C., Heo, M.-S. (2010). Effectiveness and immunomodulation of chemotherapeutants against scuticociliate *Philasterides dicentrarchi* in olive flounder. *Exp. Parasitol.*, 124: 306-314. doi: 10.1016/j.exppara.2009.11.005
- Havixbeck, J.J., Barreda, D.R. (2015). Neutrophil development, migration, and function in teleost fish. *Biology (Basel)*, 4: 715-34. doi: 10.3390/biology4040715
- Havixbeck, J.J., Rieger, A.M., Wong, M.E., Hodgkinson, J.W., Barreda, D.R. (2016). Neutrophil contributions to the induction and regulation of the acute inflammatory response in teleost fish. *J. Leukoc. Biol.*, 99: 241-252. doi: 10.1189/jlb.3HI0215-064R
- Hoare, R., Jung, S.J., Ngo, T.P.H., Bartie, K.L., Thompson, K.D., Adams, A. (2019). Efficacy of a polyvalent injectable vaccine against *Flavobacterium psychrophilum* administered to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* L.). *J. Fish Dis.*, 42: 229-236. doi: 10.1111/jfd.12919
- Hodgkinson, J.W., Grayfer, L., Belosevic, M. (2015). Biology of bony fish macrophages. *Biology (Basel)*, 4(4): 881-906. doi: 10.3390/biology4040881

- Hogan, R.J., Stuge, T.B., Clem, L.W., Miller, N.W., Chinchar, V.G. (1996). Anti-viral cytotoxic cells in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Dev. Comp. Immunol.*, 20: 115-127. doi: 10.1016/0145-305X(95)00043-S
- HogenEsch, H., O'Hagan, D.T., Fox, C.B. (2018). Optimizing the utilization of aluminum adjuvants in vaccines: you might just get what you want. *Vaccines*, 3: 51. doi: 10.1038/s41541-018-0089-x
- Hou, Z., Ye, Z., Zhang, D., Gao, C., Su, B., Song, L., Tan, F., Song, H., Wang, Y., Li, C. (2017). Characterization and expression profiling of NOD-like receptor C3 (NLRC3) in mucosal tissues of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) following bacterial challenge. *Fish Shellfish Immunol.*, 66: 231-239. doi: 10.1016/j.fsi.2017.05.014
- Hu, G.B., Li, X.P., Liu, D.H., Liu, Q.M., Zhang, S.C. (2015a). A toll-like receptor 3 homologue that is up-regulated by poly I: C and DNA virus in turbot *Scophthalmus maximus*. *J. Fish Biol.*, 86: 431-447. doi: 10.1111/jfb.12559
- Hu, G.-B., Zhang, S.-F., Yang, X., Liu, D.-H., Liu, Q.-M., Zhang, S.-C. (2015b). Cloning and expression analysis of a Toll-like receptor 22 (tlr22) gene from turbot, *Scophthalmus maximus*. *Fish Shellfish Immunol.*, 44: 399-409. doi: 10.1016/j.fsi.2015.03.001

- Hu, Y.L., Xiang, L.X., Shao, J.Z. (2010). Identification and characterization of a novel immunoglobulin Z isotype in zebrafish: Implications for a distinct B cell receptor in lower vertebrates. *Mol. Immunol.*, 47: 738-746. doi: 10.1016/j.molimm.2009.10.010
- Hwang, J.Y., Kwon, M.G., Kim, Y.J., Jung, S.H., Park, M.A., Son, M.H. (2017). Montanide IMS 1312 VG adjuvant enhances the efficacy of immersion vaccine of inactivated viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Fish Shellfish Immunol.*, 60: 420-425. doi: 10.1016/j.fsi.2016.12.011
- Iglesias, R., Paramá, A., Alvarez, M.F., Leiro, J., Fernández, J., Sanmartín, M.L. (2001). *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida) as the causative agent of scuticociliatosis in farmed turbot *Scophthalmus maximus* in Galicia (NW Spain). *Dis. Aquat. Organ.*, 46: 47-55. doi: 10.3354/dao046047
- Iglesias, R., Paramá, A., Álvarez, M., Leiro, J., Sanmartín, M.L. (2002). Antiprotozoals effective in vitro against the scuticociliate fish pathogen *Philasterides dicentrarchi*. *Dis. Aquat. Organ.*, 49: 191-197. doi: 10.3354/dao049191
- Imsland, A.K., Jonassen, T.M. (2003). Growth and age at first maturity in turbot and halibut reared under different photoperiods. *Aquac. Int.*, 11: 463-475. doi: 10.1023/B:AQUI.0000004191.43885.b2

- Iwasaki, A., Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat. Immunol.*, 16(4): 343-353. doi: 10.1038/ni.3123
- Janeway, C.A., Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 54 Pt 1, 1–13. doi: 10.1101/sqb.1989.054.01.003
- Jaso-Friedmann, L., Leary, J.H., Evans, D.L. (1993). Nonspecific cytotoxic cells in fish: antigenic cross-reactivity of a function associated molecule with the intermediate filament vimentin. *Cell. Immunol.*, 148: 208-17. doi: 10.1006/cimm.1993.1103
- Jin, C.-N., Harikrishnan, R., Moon, Y.-G., Kim, M.-C., Kim, J.-S., Balasundaram, C., Azad, I.S., Heo, M.-S. (2009). Histopathological changes of Korea cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* due to scuticociliatosis caused by histophagous scuticociliate, *Philasterides dicentrarachi*. *Vet. Parasitol.*, 161: 292-301. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.01.033
- Jones, S.R.M., MacKinnon, A.M., Salenius, K. (1999). Vaccination of freshwater-reared Atlantic salmon reduces mortality associated with infectious salmon anaemia virus. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 19: 98-101.
- Kasahara, M. (2015). Variable lymphocyte receptors: A current overview. En: *Results and Problems in Cell Differentiation*. pp. 175-192. doi: 10.1007/978-3-319-20819-0_8

- Kim, SM, Cho, J., Kim, SK, Nam, Y., Kim, K. (2004). Occurrence of scuticociliatosis in olive flounder *Paralichthys olivaceus* by *Phiasterides dicentrarchi* (Ciliophora: Scuticociliatida). Dis. Aquat. Organ., 62: 233-238. doi: 10.3354/dao062233
- Koshio, S. (2016). Immunotherapies targeting fish mucosal immunity - Current knowledge and future perspectives. Front. Immunol., 6: 643. doi: 10.3389/fimmu.2015.00643
- Kumar, G., Menanteau-Ledouble, S., Saleh, M., El-Matbouli, M. (2015). *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish. Vet. Res., 46: 103. doi: 10.1186/s13567-015-0238-4
- Kwak, K., Akkaya, M., Pierce, S.K. (2019). B cell signaling in context. Nat. Immunol., 20(8): 963-969. doi: 10.1038/s41590-019-0427-9
- Lafferty, K.D., Harvell, C.D., Conrad, J.M., Friedman, C.S., Kent, M.L., Kuris, A.M., Powell, E.N., Rondeau, D., Saksida, S.M. (2015). Infectious diseases affect marine fisheries and aquaculture economics. Ann. Rev. Mar. Sci., 7: 471-496. doi: 10.1146/annurev-marine-010814-015646
- Lama, R., Pereiro, P., Costa, M.M., Encinar, J.A., Medina-Gali, R.M., Pérez, L., Lamas, J., Leiro, J., Figueras, A., Novoa, B. (2018). Turbot (*Scophthalmus maximus*) Nk-lysin induces protection against the pathogenic parasite *Philasterides dicentrarchi* via

- membrane disruption. *Fish Shellfish Immunol.*, 82: 190-199.
doi: 10.1016/j.fsi.2018.08.004
- Lamas, J., Ellis, A.E. (1994). Atlantic salmon (*Salmo salar*) neutrophil responses to *Aeromonas salmonicida*. *Fish Shellfish Immunol.*, 4: 201-219. doi: 10.1006/fsim.1994.1019
- Lamas, J., Sanmartín, M.L., Paramá, A.I., Castro, R., Cabaleiro, S., Ruiz de Ocenda, M. V., Barja, J.L., 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: 22-26. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.03.015
- Leiro, J., Arranz, J.A., Paramá, A., Alvarez, M.F., Sanmartín, M.L. (2004). In vitro effects of the polyphenols resveratrol, mangiferin and (-)-epigallocatechin-3-gallate on the scuticociliate fish pathogen *Philasterides dicentrarchi*. *Dis. Aquat. Organ.*, 59: 171-174. doi: 10.3354/dao059171
- Leiro, J. , Piazzon, M.C., Budiño, B. , Sanmartín, M.L., Lamas, J. (2008). Complement-mediated killing of *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora) by turbot serum: relative importance of alternative and classical pathways. *Parasite Immunol.*, 30: 535-543. doi: 10.1111/j.1365-3024.2008.01052.x
- León-Rodríguez, L., Luzardo-álvarez, A., Blanco-Méndez, J., Lamas, J., Leiro, J. (2012). A vaccine based on biodegradable

- microspheres induces protective immunity against scuticociliatosis without producing side effects in turbot. *Fish Shellfish Immunol.*, 33: 21-27. doi: 10.1016/j.fsi.2012.03.028
- Li, J., Barreda, D.R., Zhang, Y.A., Boshra, H., Gelman, A.E., Lapatra, S., Tort, L., Sunyer, J.O. (2006). B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nat Immunol.*, 7(10): 1116-1124. doi: 10.1038/ni1389
- Li, S., Wang, G., Liu, D., Liu, Q., Hu, G. (2017c). Cloning and expression analysis of a Toll-like receptor 21 (TLR21) gene from turbot, *Scophthalmus maximus*. *Dev. Comp. Immunol.*, 73: 163-168. doi: 10.1016/j.dci.2017.03.021
- Li, W.-T., Lo, C., Su, C.-Y., Kuo, H., Lin, S.J.-H., Chang, H.-W., Pang, V.F., Jeng, C.-R. (2017a). Locally extensive meningoencephalitis caused by *Miamiensis avidus* (syn. *Philasterides dicentrarchi*) in a zebra shark. *Dis. Aquat. Organ.*, 126: 167-172. doi: 10.3354/dao03166
- Li, Y., Li, Yuelong, Cao, X., Jin, X., Jin, T. (2017b). Pattern recognition receptors in zebrafish provide functional and evolutionary insight into innate immune signaling pathways. *Cell. Mol. Immunol.*, 14(1): 80-89. doi: 10.1038/cmi.2016.50
- Lien, S., Koop, B.F., Sandve, S.R., Miller, J.R., Kent, M.P., Nome, T., Hvidsten, T.R., Leong, J.S., Minkley, D.R., Zimin, A.,

- Grammes, F., Grove, H., Gjuvslund, A., Walenz, B., Hermansen, R.A., Von Schalburg, K., Rondeau, E.B., Di Genova, A., Samy, J.K.A., Olav Vik, J., Vigeland, M.D., Caler, L., Grimholt, U., Jentoft, S., Inge Våge, D., De Jong, P., Moen, T., Baranski, M., Palti, Y., Smith, D.R., Yorke, J.A., Nederbragt, A.J., Tooming-Klunderud, A., Jakobsen, K.S., Jiang, X., Fan, D., Hu, Y., Liberles, D.A., Vidal, R., Iturra, P., Jones, S.J.M., Jonassen, I., Maass, A., Omholt, S.W., Davidson, W.S. (2016). The Atlantic salmon genome provides insights into rediploidization. *Nature*, 533: 200-205. doi: 10.1038/nature17164
- Lieschke, G.J., Trede, N.S. (2009). Fish immunology. *Curr. Biol.*, 19: R678-682. doi: 10.1016/j.cub.2009.06.068
- Lillehaug, A. (2014). Vaccination strategies and procedures. En: *Fish Vaccination*. Wiley Blackwell. pp. 140-152. doi: 10.1002/9781118806913.ch12
- Liu, D., Chen, J., Li, S., Hu, G. (2018). Molecular cloning and expression study on Toll-like receptor 5M in turbot, *Scophthalmus maximus*. *Dev. Comp. Immunol.*, 85: 44-50. doi: 10.1016/j.dci.2018.03.
- Liu, X., Zhang, H., Jiao, C., Liu, Q., Zhang, Y., Xiao, J. (2017) Flagellin enhances the immunoprotection of formalin-inactivated *Edwardsiella tarda* vaccine in turbot. *Vaccine*, 35: 369-374. doi: 10.1016/J.VACCINE.2016.11.031

- Lom, J., Dyková, I. (1992). Microsporidia (Phylum Microspora Sprague, 1977). En: *Developments in Aquaculture and Fisheries Science, Vol. 26. Protozoan Parasites of Fishes*. A.B. Surname (ed). pp. 125-157. Amsterdam: Elsevier.
- Lovy, J., Savidant, G.P., Speare, D.J., Wright, G.M. (2009). Langerin/CD207 positive dendritic-like cells in the haemopoietic tissues of salmonids. *Fish Shellfish Immunol.*, 27: 365-368. doi: 10.1016/j.fsi.2009.01.006
- Lu, X.-J., Chen, Q., Rong, Y.-J., Chen, F., Chen, J. (2017). CXCR3.1 and CXCR3.2 differentially contribute to macrophage polarization in teleost fish. *J. Immunol.*, 198: 4692-4706. doi: 10.4049/jimmunol.1700101
- Marchalonis, J., Edelman, G.M. (1966). Polypeptide chains of immunoglobulins from the smooth dogfish (*Mustelus canis*), *Science*, 154: 1567-1568. doi: 10.1126/science.154.3756.1567
- Magnadóttir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol.*, 20(2): 137-151. doi: 10.1016/j.fsi.2004.09.006
- Makesh, M., Sudheesh, P.S., 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 Immunol.*, 44: 156-163. doi: 10.1016/j.fsi.2015.02.003

- Mallo, N., Lamas, J., DeFelipe, A.-P., Sueiro, R.-A., Fontenla, F., Leiro, J.M. (2016). Enzymes involved in pyrophosphate and calcium metabolism as targets for anti-scudicociliate chemotherapy. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 63: 505-515. doi: 10.1111/jeu.12294
- Mallo, N., DeFelipe, A.P., Folgueira, I., Sueiro, R.A., Lamas, J., Leiro, J.M. (2017). Combined antiparasitic and anti-inflammatory effects of the natural polyphenol curcumin on turbot scudicociliatosis. *J. Fish Dis.*, 40: 205-217. doi: 10.1111/jfd.12503
- Marrack, P., McKee, A.S., Munks, M.W. (2009). Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat. Rev. Immunol.*, 9(4): 287-293. doi: 10.1038/nri2510
- Martínez-Pomares, L. (2012). The mannose receptor. *J. Leukoc. Biol.*, 92(6): 1177-1186. doi: 10.1189/jlb.0512231
- Mashoof, S., Criscitiello, M.F. (2016). Fish immunoglobulins. *Biology (Basel)*, 5(4).pii: E45. doi: 10.3390/biology5040045
- Mellman, I., Steinman, R.M. (2001). Dendritic cells: Specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*, 106(3): 255-258. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00449-4
- Meyer, A., Van De Peer, Y. (2005). From 2R to 3R: Evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD). *BioEssays*, 27(9): 937-945. doi: 10.1002/bies.20293

- Montero, J., Gómez-Abellán, V., Arizcun, M., Mulero, V., Sepulcre, M.P. (2016). Prostaglandin E2 promotes M2 polarization of macrophages via a cAMP/CREB signaling pathway and deactivates granulocytes in teleost fish. *Fish Shellfish Immunol.*, 55: 632-641. doi. 10.1016/j.fsi.2016.06.044
- Mulero, I., Sepulcre, M.P., Meseguer, J., García-Ayala, A., Mulero, V. (2007). Histamine is stored in mast cells of most evolutionarily advanced fish and regulates the fish inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104: 19434-19439. doi: 10.1073/pnas.0704535104
- Munang'andu, H.M., Evensen, Ø. (2019). Correlates of protective immunity for fish vaccines. *Fish Shellfish Immunol.*, 85: 132-140. doi: 10.1016/j.fsi.2018.03.060
- Munang'andu, H.M., Mutoloki, S., Evensen, Ø. (2015). An overview of challenges limiting the design of protective mucosal vaccines for finfish. *Front. Immunol.*, 6: 542. doi: 10.3389/fimmu.2015.00542
- Munang'andu, H.M., Paul, J., Evensen, Ø. (2016). An overview of vaccination strategies and antigen delivery systems for *Streptococcus agalactiae* vaccines in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Vaccines*, 4(4).pii: E48. doi: 10.3390/vaccines4040048
- Muñoz-Atienza, E., Aquilino, C., Syahputra, K., Al-Jubury, A., Araújo, C., Skov, J., Kania, P.W., Hernández, P.E., Buchmann,

- K., Cintas, L.M., Tafalla, C. (2019b). CK11, a teleost chemokine with a potent antimicrobial activity. *J. Immunol.*, 202: 857-870. doi: 10.4049/jimmunol.1800568
- Muñoz-Atienza, E., Távora, C., Díaz-Rosales, P., Llanco, L., Serrano-Martínez, E., Tafalla, C. (2019a). Local regulation of immune genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) naturally infected with *Flavobacterium psychrophilum*. *Fish Shellfish Immunol.*, 86: 25-34. doi: 10.1016/j.fsi.2018.11.027
- Nakanishi, T., Shibasaki, Y., Matsuura, Y. (2015). T cells in fish. *Biology (Basel)*, 4(4): 640-663. doi: 10.3390/biology4040640
- Nelson, J.S., Grande, T.C., Wilson, M.V.H. (2016). *Fishes of the World. Fifth Edition. Wiley Blackwell.* doi: 10.1002/9781119174844
- Nie, L., Cai, S.Y., Sun, J., Chen, J. (2019). MicroRNA-155 promotes pro-inflammatory functions and augments apoptosis of monocytes/macrophages during *Vibrio anguillarum* infection in ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Fish Shellfish Immunol.*, 86: 70-81. doi: 10.1016/j.fsi.2018.11.030
- 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 Immunol.*, 38: 244-254. doi: 10.1016/j.fsi.2014.03.020

- Ohno, S. (1970). Introduction. En: *Evolution by Gene Duplication*. Springer Berlin Heidelberg. pp. 1-2. doi: 10.1007/978-3-642-86659-3_1
- Ordás, M.C., Costa, M.M., Roca, F.J., López-Castejón, G., Mulero, V., Meseguer, J., Figueras, A., Novoa, B. (2007). Turbot TNF α gene: Molecular characterization and biological activity of the recombinant protein. *Mol. Immunol.*, 44: 389-400. doi: 10.1016/J.MOLIMM.2006.02.028.
- Palenzuela, O., Redondo, M., Álvarez-Pellitero, P. (2002). Description of *Enteromyxum scophthalmi* gen. nov., sp. nov. (Myxozoa), an intestinal parasite of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) using morphological and ribosomal RNA sequence data. *Parasitology*, 124(4): 369-379. doi: 10.1017/S0031182001001354
- Palić, D., Ostojić, J., Andreasen, C.B., Roth, J.A. (2007). Fish cast NETs: Neutrophil extracellular traps are released from fish neutrophils. *Dev. Comp. Immunol.*, 31: 805-816. doi: 10.1016/j.dci.2006.11.010
- 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: 10.1016/S0044-8486(02)00523-9
- Paramá, A., Iglesias, R., Alvarez, F., Leiro, J.M., Quintela, J.M., Peinador, C., González, L., Riguera, R., Sanmartín, M.L. (2004). In

- vitro efficacy of new antiprotozoals against *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida). *Dis. Aquat. Organ.*, 62: 97-102. doi: 10.3354/dao062097
- Paramá, A., Luzardo, A., Blanco-Méndez, J., Sanmartín, M.L., Leiro, J. (2005). *In vitro* efficacy of glutaraldehyde-crosslinked chitosan microspheres against the fish-pathogenic ciliate *Philasterides dicentrarchi*. *Dis. Aquat. Organ.*, 64: 151-158. doi: 10.3354/dao064151
- Paramá, A., Piazzon, M.C., Lamas, J., Sanmartín, M.L., Leiro, J. (2007). *In vitro* activity of the nonsteroidal anti-inflammatory drug indomethacin on a scuticociliate parasite of farmed turbot. *Vet. Parasitol.*, 148: 318-324. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.06.018
- Parra, D., Korytář, T., Takizawa, F., Sunyer, J.O. (2016). B cells and their role in the teleost gut. *Dev. Comp. Immunol.*, 64: 150-166. doi: 10.1016/j.dci.2016.03.013
- Patel, B., Banerjee, R., Basu, M., Lenka, S., Samanta, M., Das, S. (2016). Molecular cloning of IgZ heavy chain isotype in *Catla catla* and comparative expression profile of IgZ and IgM following pathogenic infection. *Microbiol. Immunol.*, 60: 561-567. doi: 10.1111/1348-0421.12399
- Pauly, D., Christensen, V., Guénette, S., Pitcher, T.J., Sumaila, U.R., Walters, C.J., Watson, R., Zeller, D. (2002). Towards sustainability in world fisheries. *Nature*, 418(6898): 689-695. doi: 10.1038/nature01017

- Peddie, S., Zou, J., Secombes, C.J. (2002). Immunostimulation in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intraperitoneal administration of Ergosan. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 86: 101-113. doi: 10.1016/S0165-2427(02)00019-3
- Pereiro, P., Martinez-Lopez, A., Falco, A., Dios, S., Figueras, A., Coll, J.M., Novoa, B., Estepa, A. (2012). Protection and antibody response induced by intramuscular DNA vaccine encoding for viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) G glycoprotein in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Shellfish Immunol.*, 32: 1088-1094. doi: 10.1016/j.fsi.2012.03.004
- Pereiro, P., Costa, M.M., Díaz-Rosales, P., Dios, S., Figueras, A., Novoa, B. (2014). The first characterization of two type I interferons in turbot (*Scophthalmus maximus*) reveals their differential role, expression pattern and gene induction. *Dev. Comp. Immunol.*, 45: 233-244. doi: 10.1016/j.dci.2014.03.006
- Pereiro, P., Forn-Cuni, G., Figueras, A., Novoa, B. (2016). Pathogen-dependent role of turbot (*Scophthalmus maximus*) interferon-gamma. *Fish Shellfish Immunol.*, 59: 25-35. doi: 10.1016/j.fsi.2016.10.
- Pereiro, P., Figueras, A., Novoa, B. (2019). Insights into teleost interferon-gamma biology: An update. *Fish Shellfish Immunol.*, 90: 150-164. doi: 10.1016/j.fsi.2019.04.002
- Piazzon, C., Lamas, J., Castro, R., Budiño, B., Cabaleiro, S., Sanmartín, M., Leiro, J. (2008). Antigenic and cross-protection studies

- on two turbot scuticociliate isolates. *Fish Shellfish Immunol.*, 25: 417-424. doi: 10.1016/j.fsi.2008.05.012
- Piazzon, C., Lamas, J., Leiro, J.M. (2011). Role of scuticociliate proteinases in infection success in turbot, *Psetta maxima* (L.). *Parasite Immunol.*, 33: 535-544. doi: 10.1111/j.1365-3024.2011.01310.x
- Piazzon, M.C., Leiro, J., Lamas, J. (2013). Fish immunity to scuticociliate parasites. *Dev. Comp. Immunol.*, 41: 248-56. doi: 10.1016/j.dci.2013.05.022
- Piazzon, M.C., Lutfall, G., Forlenza, M. (2016). IL10, a tale of an evolutionarily conserved cytokine across vertebrates. *Crit. Rev. Immunol.*, 36: 99-129. doi: 10.1615/CritRevImmunol.2016017480
- Pulendran, B., Ahmed, R. (2011). Immunological mechanisms of vaccination. *Nat. Immunol.*, 12(6): 509-517. doi: 10.1038/ni.2039
- Quintela, J.M., Peinador, C., González, L., Iglesias, R., Paramá, A., Álvarez, F., Sanmartín, M.L., Riguera, R. (2003). Piperazine N-substituted naphthyridines, pyridothienopyrimidines and pyridothienotriazines: New antiprotozoals active against *Philasterides dicentrarchi*. *Eur. J. Med. Chem.*, 38: 265-275. doi: 10.1016/S0223-5234(03)00032-1
- Ramos, M.F., Costa, A.R., Barandela, T., Saraiva, A., Rodrigues, P.N. (2007). Scuticociliate infection and pathology in cultured turbot

- Scophthalmus maximus* from the north of Portugal. Dis. Aquat. Organ., 74: 249-253. doi: 10.3354/dao074249
- Reis, M.I.R., do Vale, A., Pereira, P.J.B., Azevedo, J.E., dos Santos, N.M.S. (2012). Caspase-1 and IL-1 β processing in a teleost fish. PLoS One, 7(11): e50450. doi: 10.1371/journal.pone.0050450
- Reite, O.B. (1965.) A phylogenetical approach to the functional significance of tissue mast cell histamine. Nature, 206: 1334-1336. doi: 10.1038/2061334a0
- Reite, O.B. (1972). Comparative physiology of histamine. Physiol. Rev., 52: 778-819. doi: 10.1152/physrev.1972.52.3.778
- Richards, M.P., Pettitt, P.B., Stiner, M.C., Trinkaus, E. (2001). Stable isotope evidence for increasing dietary breadth in the European mid-Upper Paleolithic. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 98: 6528-6532. doi: 10.1073/pnas.111155298
- Robertsen, B. (2018). The role of type I interferons in innate and adaptive immunity against viruses in Atlantic salmon, Dev. Comp. Immunol., 80: 41-52. doi: 10.1016/J.DCI.2017.02.005.
- Romalde, J.L., Magariños, B. (1997). Immunization with bacterial antigens: pasteurellosis. Dev. Biol. Stand., 90: 167-77.
- Ronza, P., Bermúdez, R., Losada, A.P., Sitjà-Bobadilla, A., Pardo, B.G., Quiroga, M.I. (2015). Immunohistochemical detection and gene expression of TNF α in turbot (*Scophthalmus maximus*) enteromyxosis. Fish Shellfish Immunol., 47: 368-376. doi: 10.1016/j.fsi.2015.09.032

- Salinas, I. (2015). The mucosal immune system of teleost fish. *Biology (Basel)*, 4(3): 525-39. doi: 10.3390/biology4030525
- Sanmartín, M.L., Paramá, A., Castro, R., Cabaleiro, S., Leiro, J., Lamas, J., Barja, J.L. (2008). Vaccination of turbot, *Psetta maxima* (L.), against the protozoan parasite *Philasterides dicentrarchi*: Effects on antibody production and protection. *J. Fish Dis.*, 31: 135-140. doi: 10.1111/j.1365-2761.2007.00876.x
- Santos, Y., García-Marquez, S., Pereira, P.G., Pazos, F., Riaza, A., Silva, R., El Morabit, A., Ubeira, F.M. (2005). Efficacy of furunculosis vaccines in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.): Evaluation of immersion, oral and injection delivery. *J. Fish Dis.*, 28: 165-172. doi: 10.1111/j.1365-2761.2005.00610.x
- Schroeder, H.W.J., Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 125: S41-52. doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.046
- Secombes, C.J., Wang, T., Bird, S. (2011). The interleukins of fish. *Dev. Comp. Immunol.*, 35: 1336-1345. doi: 10.1016/j.dci.2011.05.001
- Sfacteria, A., Brines, M., Blank, U. (2015). The mast cell plays a central role in the immune system of teleost fish. *Mol. Immunol.*, 63: 3-8. doi: 10.1016/j.molimm.2014.02.007
- Shortman, K., Heath, W.R. (2010). The CD8⁺ dendritic cell subset. *Immunol. Rev.*, 234: 18-31. doi: 10.1111/j.0105-2896.2009.00870.x

- Snieszko S, Piotrowska W, Kocylowski B, Marek K. (1938). Badania bakteriologiczne i serologiczne nad bakteriami posocznicy karpia. Mémoires de l'Institut d'Ichthyobiologie et Pisciculture de la Station de Pisciculture Expérimentale à Mydlniki de l'Université Jagiellonienne à Cracovie, Nr. 38.
- Snieszko, S.F. (1974). The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *J. Fish Biol.*, 6: 197-208. doi: 10.1111/j.1095-8649.1974.tb04537.x
- Soletto, I., Fischer, U., Tafalla, C., Granja, A.G. (2018). Identification of a potential common ancestor for mammalian cross-presenting dendritic cells in teleost respiratory surfaces. *Front. Immunol.*, 9: 59. doi: 10.3389/fimmu.2018.00059
- Soletto, I., Granja, A.G., Simón, R., Morel, E., Díaz-Rosales, P., Tafalla, C. (2019). Identification of CD8 α ⁺ dendritic cells in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestine. *Fish Shellfish Immunol.*, 89: 309-318. doi: 10.1016/j.fsi.2019.04.001
- Somamoto, T., Koppang, E.O., Fischer, U. (2014). Antiviral functions of CD8⁺ cytotoxic T cells in teleost fish. *Dev. Comp. Immunol.*, 43(2): 197-204. doi: 10.1016/j.dci.2013.07.014
- Tacchi, L., Musharrafieh, R., Larragoite, E.T., Crossey, K., Erhardt, E.B., Martin, S.A.M., Lapatra, S.E., Salinas, I. (2014). Nasal immunity is an ancient arm of the mucosal immune system of vertebrates. *Nat. Commun.*, 5: 5205. doi: 10.1038/ncomms6205

- Tadiso, T.M., Lie, K.K., Hordvik, I. (2011). Molecular cloning of IgT from Atlantic salmon, and analysis of the relative expression of τ , μ and δ in different tissues. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 139: 17-26. doi: 10.1016/j.vetimm.2010.07.024
- Tafalla, C., Bøgwald, J., Dalmo, R.A. (2013). Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: Current knowledge and future perspectives. *Fish Shellfish Immunol.*, 35(6): 1740-1750. doi: 10.1016/j.fsi.2013.02.029
- Tafalla, C., González, L., Castro, R., Granja, A.G. (2017). B cell-activating factor regulates different aspects of B cell functionality and is produced by a subset of splenic B cells in teleost fish. *Front. Immunol.*, 8: 295. doi: 10.3389/fimmu.2017.00295
- Tang, X., Du, Y., Sheng, X., Xing, J., Zhan, W. (2018). Molecular cloning and expression analyses of immunoglobulin tau heavy chain (IgT) in turbot, *Scophthalmus maximus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 203: 1-12. doi: 10.1016/j.vetimm.2018.07.011
- Toranzo, A.E., Devesa, S., Romalde, J.L., Lamas, J., Riaza, A., Leiro, J., Barja, J.L. (1995). Efficacy of intraperitoneal and immersion vaccination against *Enterococcus* sp. infection in turbot. *Aquaculture*, 134: 17-27. doi: 10.1016/0044-8486(95)00038-4
- Toranzo, A.E., Magariños, B., Romalde, J.L. (2005). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems.

- Aquaculture, 246: 37-61. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.01.002
- Umehara, A., Kosuga, Y., Hirose, H. (2003). Scuticociliata infection in the weedy sea dragon *Phyllopteryx taeniolatus*. Parasitol. Int., 52: 165-168. doi: 10.1016/S1383-5769(02)00080-6
- Van Muiswinkel, W.B. (2008). A history of fish immunology and vaccination I. The early days. Fish Shellfish Immunol., 25(4): 397-408. doi: 10.1016/j.fsi.2008.02.019
- Vinay, T.N., Kim, Y.J., Jung, M.H., Kim, W.S., Kim, D.H., Jung, S.J. (2013). Inactivated vaccine against viral hemorrhagic septicemia (VHS) emulsified with squalene and aluminum hydroxide adjuvant provides long term protection in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Vaccine, 31: 4603-4610. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.07.036
- Velázquez, J., Acosta, J., Lugo, J.M., Reyes, E., Herrera, F., González, O., Morales, A., Carpio, Y., Estrada, M.P. (2018) Discovery of immunoglobulin T in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): A potential molecular marker to understand mucosal immunity in this species, Dev. Comp. Immunol., 88: 124-136. doi: 10.1016/J.DCI.2018.07.013.
- Walker, P.J., Winton, J.R., (2010). Emerging viral diseases of fish and shrimp. Vet. Res., 41(6): 51. doi: 10.1051/vetres/2010022
- Wang, B., Wang, P., Wu, Z.H., Lu, Y.S., Wang, Z.L., Jian, J.C. (2016). Molecular cloning and expression analysis of IgD in

- Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in response to *Streptococcus agalactiae* stimulus. *Int. J. Mol. Sci.*, 17(3): 348. doi: 10.3390/ijms17030348
- Wang, G.L., Wang, M.C., Liu, Y.L., Zhang, Q., Li, C.F., Liu, P.T., Li, E.Z., Nie, P., Xie, H.X. (2018). Identification, expression analysis, and antibacterial activity of NK-lysin from common carp *Cyprinus carpio*. *Fish Shellfish Immunol.*, 73: 11-21. doi: 10.1016/j.fsi.2017.11.030
- Whyte, S.K. (2007). The innate immune response of finfish--a review of current knowledge. *Fish Shellfish Immunol.* 23: 1127-1151. doi: 10.1016/j.fsi.2007.06.005
- Wiegertjes, G.F., Wentzel, A.S., Spalink, H.P., Elks, P.M., Fink, I.R. (2016). Polarization of immune responses in fish: The 'macrophages first' point of view. *Mol. Immunol.*, 69: 146-156. doi: 10.1016/j.molimm.2015.09.026
- Wiens, G.D., Glenney, G.W. (2011). Origin and evolution of TNF and TNF receptor superfamilies. *Dev. Comp. Immunol.*, 35: 1324-1335. doi: 10.1016/j.dci.2011.03.031
- Woo, P.T.K., Li, S. (1990). *In vitro* attenuation of *Cryptobia salmositica* and its use as a live vaccine against Cryptobiosis in *Oncorhynchus mykiss*. *J. Parasitol.*, 76, 752-755. doi: 10.2307/3283000
- Wu, J., Shi, Y.-H., Zhang, X.-H., Li, C.-H., Li, M.-Y., Chen, J. (2015). Molecular characterization of an IL-1 β gene from the

- large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) and its effect on fish defense against *Vibrio alginolyticus* infection. *Dongwuxue Yanjiu*, 36(3): 133-141.
- Yasumoto, S., Kuzuya, Y., Yasuda, M., Yoshimura, T., Miyazaki, T. (2006). Oral immunization of common carp with a liposome vaccine fusing koi herpesvirus antigen. *Fish Pathol.*, 41: 141-145. doi: 10.3147/jsfp.41.141
- Yona, S., Kim, K.W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guilliams, M., Misharin, A., Hume, D.A., Perlman, H., Malissen, B., Zelzer, E., Jung, S. (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*, 38: 79-91. doi: 10.1016/j.immuni.2012.12.001
- Yoshinaga, T., Nakazoe, J. (1993). Isolation and *in vitro* cultivation of an unidentified ciliate causing scuticociliatosis in Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Pathol.*, 28: 131-134. doi: 10.3147/jsfp.28.131
- Yu, Y.Y., Kong, W., Yin, Y.X., Dong, F., Huang, Z.Y., Yin, G.M., Dong, S., Salinas, I., Zhang, Y.A., Xu, Z. (2018). Mucosal immunoglobulins protect the olfactory organ of teleost fish against parasitic infection. *PLoS Pathog.*, 14(11): e1007251. doi: 10.1371/journal.ppat.1007251
- Zhang, Y.A., 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. *Nat Immunol.*, 11(9): 827-835. doi: 10.1038/ni.1913
- Zhang, H., Hu, G., Liu, Q., Zhang, S. (2016). Cloning and expression study of a Toll-like receptor 2 (tlr2) gene from turbot, *Scophthalmus maximus*. *Fish Shellfish Immunol.*, 59: 137-148. doi: 10.1016/j.fsi.2016.10.001
- Zhang, N., Zhang, X.J., Chen, D.D., Oriol Sunyer, J., Zhang, Y.A. (2017). Molecular characterization and expression analysis of three subclasses of IgT in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev. Comp. Immunol.*, 70: 94–105. doi: 10.1016/j.dci.2017.01.001
- Zhou, Q.J., Wang, J., Liu, M., Qiao, Y., Hong, W.S., Su, Y.Q., Han, K.H., Ke, Q.Z., Zheng, W.Q. (2016). Identification, expression and antibacterial activities of an antimicrobial peptide NK-lysin from a marine fish *Larimichthys crocea*. *Fish Shellfish Immunol.*, 55: 195-202. doi: 10.1016/j.fsi.2016.05.035
- Zou, J., Secombes, C.J. (2011). Teleost fish interferons and their role in immunity. *Dev. Comp. Immunol.*, 35: 1376-1387. doi: 10.1016/j.dci.2011.07.001
- Zou, J., Secombes, C.J. (2016). The function of fish cytokines. *Biology (Basel)*, 5(2).pii: E23. doi: 10.3390/biology5020023
- Zylberberg, L., Chanet, B., Wagemans, F., Meunier, F.J. (2003). Structural peculiarities of the tubercles in the skin of the turbot, *Scophthalmus maximus* (L., 1758) (Osteichthyes,

Pleuronectiformes, Scophthalmidae). *J. Morphol.*, 258: 84-96.
doi: 10.1002/jmor.10130





OBJETIVOS



Objetivos

Conocer la respuesta inmunitaria generada o qué componentes del sistema inmunitario se estimulan tras la vacunación o una infección nos puede ayudar a predecir la eficacia de dicha vacunación. Hasta hace muy poco, los efectos de la vacunación en peces se medían analizando la migración celular, el nivel de anticuerpos en suero o la protección generada tras la infección experimental. Un problema relevante en el análisis de la respuesta en peces ha sido la poca similitud entre genes/proteínas de diferentes especies, lo que ha obligado a desarrollar herramientas para cada caso en particular. En el caso del rodaballo, la publicación del genoma en el año 2016 supuso un avance clave para todo lo relacionado con el análisis genético, molecular y celular del sistema inmunitario de rodaballo. Además, el estudio de los genes o proteínas en peces óseos es de gran importancia

Nuestro grupo de investigación ha desarrollado una vacuna frente a *Philasterides dicentrarchi* que induce una buena protección en rodaballo frente a la cepa homóloga del parásito. Sin embargo, durante años hemos observado que los grupos de peces inyectados con adyuvante oleoso crecen menos que los grupos control, son más susceptibles a la infección y presentan daños relevantes en la cavidad peritoneal. Por tales motivos, buscar nuevos adyuvantes que tengan menos efectos adversos, pero que induzcan una protección similar a los usados actualmente ha sido una prioridad.

En base a lo descrito previamente, nos hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Analizar los cambios en la expresión génica de las células peritoneales del rodaballo en respuesta a la vacunación, utilizando un chip de ADN (*microarray*) rico en genes relacionados con el sistema inmunitario.
2. Analizar cómo afecta la vacunación a la respuesta inmunitaria en el bazo, incluyendo la expresión de genes del sistema inmunitario y las poblaciones de células B.
3. Caracterizar el receptor de manosa de tipo 1 (Mrc1) de rodaballo y estudiar su papel como puente entre la respuesta inmunidad innata y la adquirida durante la vacunación.
4. Caracterizar la peroxidasa de neutrófilos de rodaballo y analizar cómo afecta a la expresión de otros genes.
5. Desarrollar nuevos adyuvantes basados en polisacáridos que induzcan una buena protección en rodaballo frente *P. dicentrarchi*, sin los efectos adversos que provocan los adyuvantes que se emplean en las vacunas comerciales.

CAPÍTULO I

MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN CÉLULAS PERITONEALES DEL RODABALLO TRAS LA VACUNACIÓN



Modulación de la expresión génica en células peritoneales del rodaballo tras la vacunación

1. Introducción

La vacunación por inyección es el método que proporciona la mejor respuesta inmunitaria e induce una mayor protección en peces (Lillehaug, 2014). Aunque las vacunas pueden ser administradas por vía intraperitoneal o intramuscular, las primeras son las más usadas. Por otra parte, los antígenos por sí mismos son generalmente poco inmunogénicos, siendo necesario emplear adyuvantes para su mejorar su antigenicidad (Tafalla *et al.*, 2013).

Son muchos los trabajos publicados sobre vacunas conteniendo adyuvantes oleosos, en los cuales se analiza la respuesta inmunitaria generada en peces, incluido los niveles de IgM específica en suero y la protección inducida por estas tras la realización de infecciones experimentales. Por ejemplo, la inmunización de trucha arcoíris inyectada con la bacterina *Yersinia ruckeri* y el adyuvante oleoso MontanideTM ISA 763 A VG (Seppic) generó un aumento significativo en el nivel de IgM en suero, el número de células IgM+ en el bazo y reguló positivamente varios genes relacionados con el sistema inmunitario en el bazo, riñón anterior e hígado (Jaafar *et al.*, 2015). El análisis de la respuesta inmunitaria en salmónidos indica una expresión simultánea de las citocinas Th1, Th2 y Treg después de la administración de vacunas basadas en adyuvantes oleosos, sin que

predomine una u otra respuesta (Mutoloki *et al.*, 2010; Kumari *et al.*, 2013; Jaafar *et al.*, 2015). A pesar de que los adyuvantes basados en aluminio se emplean ampliamente en mamíferos, se usan con mucha menor frecuencia en peces, probablemente porque la respuesta inmunitaria es más limitada que la producida por los adyuvantes oleosos más empleados (Jiao *et al.*, 2010). El conocimiento acerca de la respuesta inmunitaria provocada por adyuvantes de hidróxido de aluminio en peces es muy escaso, excepto en lo que respecta al nivel de anticuerpos específicos generados. Aunque tradicionalmente se ha considerado que los adyuvantes basados en hidróxido de aluminio generan preferentemente respuestas Th2, estudios recientes en mamíferos han sugerido que estos adyuvantes pueden potenciar respuestas de tipo Th1 o de tipo Th2, dependiendo de la ruta de vacunación empleada (He *et al.*, 2015). Varias vacunas basadas en microesferas son capaces de inducir la activación tanto del sistema inmunitario innato como del adquirido en peces (Behera y Swain, 2012; Harikrishnan *et al.*, 2012; Leon-Rodriguez *et al.*, 2012, 2013), aunque no hay información disponible sobre cómo afectan estas vacunas a la actividad de las células peritoneales o a las células de los órganos linfoides. Asimismo, se desconoce lo que ocurre en la cavidad peritoneal de los peces después de la administración de la vacuna. La vacunación induce la expresión de genes inflamatorios en los órganos linfoides (Fredriksen *et al.*, 2011; Dan *et al.*, 2013) y se ha sugerido que se generan respuestas Th1/Th2/Th17. Sin embargo, son necesarias

herramientas más sensibles para poder entender el tipo de respuesta producida y permitir de este modo un análisis más complejo y profundo de la respuesta inmunitaria, a imagen de lo que ocurre en mamíferos. Las vacunas, especialmente las que contienen adyuvantes oleosos, pueden causar importantes lesiones en los peces (Noia *et al.*, 2014). Estas lesiones, incluidos granulomas y adhesiones entre órganos internos o entre los órganos y la cavidad peritoneal, son variables dependiendo del tipo de adyuvante empleado. Muchas de las células libres de la cavidad peritoneal tienden a adherirse a la vacuna, formando masas que se unen a la pared de la cavidad peritoneal. Las masas de vacuna y células contienen células similares a macrófagos y células apoptóticas (Noia *et al.*, 2014). Para la generación de estas masas de vacuna y células debe ser necesario una expresión intensa de genes relacionados con la unión entre células o entre célula y matriz extracelular, así como de genes relacionados con el esqueleto de actina. Los procesos de diferenciación, polarización, migración y adhesión están afectados por el papel del citoesqueleto en la inmunidad innata y la autodefensa celular (Mostowy y Shenoy, 2015). En este estudio, hemos empleado un oligo-*microarray* con 43803 *spots* rico en genes relacionados con la inmunidad, la reproducción y con genes relacionados con la adhesión celular y el citoesqueleto (Ribas *et al.*, 2013), con el objetivo de analizar la respuesta celular temprana en la cavidad peritoneal después de la vacunación.

2. Material y métodos

2.1. Animales de experimentación

Se usaron rodaballos, *Scophthalmus maximus* (L.), de aproximadamente 30 g de peso obtenidos de una granja local. Los peces se mantuvieron en tanques de 250 l con aireación y recirculación de agua de mar a 16 °C y se alimentaron diariamente con piensos comerciales. Los peces se dejaron aclimatar a las condiciones de laboratorio durante dos semanas antes del comienzo de los experimentos. Todos los protocolos experimentales realizados en el presente estudio siguieron la legislación europea (Directiva 2010/63 / UE), los requisitos legislativos españoles relacionados con el uso de animales para experimentación (RD 53/2013) y fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Santiago de Compostela (España). Para todos los procedimientos, los peces se anestesiaron con benzocaína (50 mg/l) y la eutanasia fue administrada mediante decapitación.

2.2. *Philasterides dicentrarchi*: cultivo y preparación del antígeno de membrana

Los parásitos *Philasterides dicentrarchi* (aislado C1) se obtuvieron a partir del líquido ascítico de rodaballos infectados de forma natural. Estos ciliados se mantuvieron y cultivaron en el laboratorio según lo descrito previamente por Piazzon *et al.* (2008). La fracción de membrana del ciliado se obtuvo según lo descrito por

Budiño *et al.* (2012). Brevemente, los ciliados ($1,5 \times 10^7$) se resuspendieron en tampón HEPES con dibucaína y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente. La desciliación se verificó mediante observación al microscopio óptico y los parásitos se lavaron tres veces mediante centrifugación a 600 g durante 5 min en tampón fosfato salino (PBS) a 4 °C. El precipitado se resuspendió en tampón PBS con sacarosa 0,25 M, se trató con ultrasonidos y se centrifugó a 8000 g durante 5 min. A continuación, el precipitado se disolvió en 3 ml de tampón HEPES y se añadió a un tubo que contenía un gradiente de sacarosa (0,5 M, 1 M y 0,15 M). Después de centrifugar a 6000 g, la fase de sacarosa 0,1 M se retiró y se centrifugó a 11000 g durante 20 min. Posteriormente, el precipitado se resuspendió en tampón HEPES con 0,5% de Triton X-114 durante 15 h a 0 °C para solubilizar las proteínas de membrana, se centrifugó a 8000 g durante 10 min y el sobrenadante se concentró con una tripa de diálisis (Millipore). La concentración de la proteína se determinó por el método Bradford (Bio-Rad Protein Assay kit, Bio-Rad), con albúmina de suero bovina (BSA) (Sigma–Aldrich) como estándar. Las proteínas de membrana de *Philasterides dicentrarchi* (10 g) se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 10% (Fig. 1), según lo descrito con anterioridad (Budiño *et al.*, 2012).

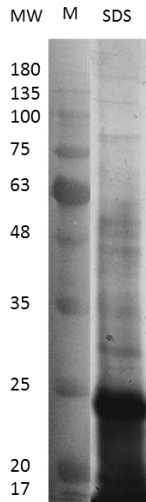


Fig. 1. SDS-PAGE (10%) de proteínas de membrana de *P. dicentrarchi*, en condiciones reductoras, teñido con plata. Carril M, marcadores moleculares en kDa.

2.3. Preparación y administración de la vacuna

Se emplearon seis grupos de peces (en duplicado, 114 peces en total). El grupo control (n=24) se inyectó intraperitonealmente con 0,1 ml de PBS. Los demás grupos (n=18 peces/grupo) se inyectaron intraperitonealmente con 230 μ g de antígeno en PBS unido covalentemente a la superficie de 5 mg de microsferas (León-Rodríguez *et al.*, 2012; Noia *et al.*, 2014), o con una mezcla (1:1, v:v) de antígeno y uno de los siguientes adyuvantes: adyuvante completo de Freund (FCA; Sigma-Aldrich), gel de hidróxido de aluminio (Alhydrogel, Sigma-Aldrich) o Matrix-Q (Isconova) (5 μ g/pez). Se recogieron muestras de cuatro peces en cada grupo control y de tres

peces de los demás grupos a 1, 3 y 5 días después de la inyección. Para determinar el efecto de la vacunación en los niveles de anticuerpos, seis grupos de peces (cada uno n=10) se inyectaron intraperitonealmente a los días 0 y 30 con 0,1 ml de PBS, antígeno de membrana o antígeno y uno de los siguientes adyuvantes: microesferas, Matrix-Q, Alhydrogel o FCA, tal y como se indicó anteriormente. La temperatura del agua fue de 17 °C. Una semana después de la segunda dosis, se determinaron los niveles de anticuerpos específicos del suero. La sangre de los peces se obtuvo mediante punción en la vena caudal, dejándose coagular posteriormente durante 16 h a 4 °C. Las muestras se centrifugaron a 4000 g y se recogió el suero.

2.4. Determinación de IgM específicas mediante ELISA en suero de rodaballo

El nivel de la IgM específica contra *P. dicentrarchi* se midió mediante ELISA doble indirecto, de acuerdo a lo descrito previamente (Piazzon *et al.* (2008), con modificaciones menores. En resumen, las placas de ELISA de 96 pocillos (IWAKI) se tapizaron con 10 mg/ml de antígeno de membrana de *P. dicentrarchi* en tampón carbonato-bicarbonato 0,05 M (pH 9,6), e incubaron toda la noche a 4 °C. Las placas se lavaron tres veces con Tampón Tris Salino (TBS) (50 mM Tris, 0,15 M NaCl, pH 7,4) con 0,05% de Tween 20 (TBS-T₂) y se bloquearon durante 1 h a 37 °C con TBS con 0,2% de Tween 20 (TBS-T₁) y 5% de leche desnatada. A continuación, se lavaron 5 veces

con TBS-T₂. Posteriormente, se incubaron 1 h a temperatura ambiente con 100 µl de una dilución de TBS-T₁ con 1% de leche desnatada a la que se le añadió suero de rodaballo, tras lo cual se lavaron 5 veces con TBS-T₂. Para la detección de la IgM específica, se utilizó anti-IgM de rodaballo hecho en ratón (UR3) (Estévez *et al.* 1994), diluido 1:400 en TBS-T₁ con 1% de leche desnatada en polvo, y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron 5 veces con TBS-T₂ y se incubaron con una dilución de anticuerpo conejo antiratón marcado con peroxidasa (1:1000) (Dako), durante 30 min a temperatura ambiente en TBS-T₁. Después de 10 lavados en TBS-T₂, se añadieron 50 µl de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Sigma-Aldrich) a cada pocillo y se incubó la placa durante 20 min a temperatura ambiente. La reacción se paró con 50 µl de H₂SO₄ 2 M por pocillo y la densidad óptica se midió a 450 nm en un lector de placas modelo 680 (Bio-Rad).

2.5. Aislamiento de las células peritoneales

Los peces se desangraron mediante punción en la vena caudal para prevenir la presencia de eritrocitos en la cavidad peritoneal. La cavidad se lavó cuidadosamente con 5 ml de PBS frío y el número de células se determinó mediante un hemocitómetro. Se realizaron frotis de células en portaobjetos, los cuales se tiñeron con Hemacolor (Merck) o con diaminobenzidina (Sigma-Aldrich) y con hematoxilina, de acuerdo con Kiernan (1981). Finalmente, las suspensiones celulares se lavaron dos veces con PBS frío mediante centrifugación a 300 g

durante 5 min. Tras otra centrifugación, se retiró el sobrenadante y los tubos con los precipitados se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C hasta la extracción de ARN.

2.6. Extracciones de ARN e hibridación del *microarray*

Las células estimuladas se precipitaron y el ARN total se extrajo mediante el kit *RNAeasy Mini Kit* (Qiagen) conforme a las instrucciones del fabricante. La calidad del ARN y su cuantificación se determinaron, respectivamente, en un Bioanalyzer (Bonsai Technologies) y en un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop® Technologies), previamente a la hibridación. El ARN extraído de las células peritoneales mostró gran calidad y el ARN de todas las muestras tuvo una integridad superior a 8,9 y generalmente por encima de 9. Se empleó un oligo-*microarray* Agilent 4×44K (43,840 *spots* correspondientes a transcritos del rodaballo y 1417 a los controles de Agilent) (Ribas *et al.*, 2013) para evaluar los perfiles de expresión génica bajo las condiciones analizadas. La plataforma *microarray* Agilent-038160 se envió al repositorio *Gene Expression Omnibus* (GEO) bajo el número de acceso GPL19564. Se emplearon doce portaobjetos en el experimento con muestras de tres o cuatro grupos de peces. Uno de los grupos fue siempre el de peces inyectados con PBS y los otros fueron grupos muestreados al mismo tiempo que el grupo control. En total, se analizaron 42 *arrays*. Las hibridaciones fueron realizadas por el personal de la *Unidade de Expresión Xénica-*

Tecnología Agilent de la *Plataforma Tecnológica de Secuenciación e Xenómica Funcional* de la Universidad de Santiago de Compostela (USC). Brevemente, 50 ng de ARN total se marcó empleando el *Low Input Quick Amp Labeling Kit, One-Color (Cy3)* (Agilent Technologies). Las copias de ARN se hibridaron durante toda la noche con los tampones correspondientes durante 17 h a 65 °C y se lavaron al día siguiente. Los portaobjetos hibridados se escanearon en un escáner de *microarray* Agilent G2565B (Agilent Technologies). Todos los pasos se realizaron en días consecutivos por el mismo investigador. Las imágenes del escáner se segmentaron con *Agilent Feature* y el software *Agilent* se aplicó para prevenir la saturación en el rango de la intensidad más elevada.

2.7. Análisis del *microarray*

El procesado y filtración del *microarray* se llevó a cabo según lo descrito anteriormente (Millan *et al.*, 2010; Dominguez *et al.*, 2013). La señal se recogió y procesó en un escáner Agilent (G2565B, Agilent Technologies). Las imágenes del escáner se segmentaron con el software *Agilent Feature Extraction Software (v9.5)* aplicando el protocolo GE1-v5_95, el cual se empleó para obtener los datos *raw*. El valor de la señal procesada (*gProcessed-Signal*) se escogió para el análisis estadístico. Todos los *microarrays* se sometieron a control de calidad y filtrado antes del análisis estadístico, siguiendo los criterios descritos por Millan *et al.* (2010). Los datos presentados en este

trabajo se han depositado en el Omnibus de expresión génica del NCBI (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) y están disponibles con el número de acceso GSE82021.

Se asumió la normalidad log (lognormalidad) de la señal del *microarray* (y la señal del gen) y, por lo tanto, en el análisis estadístico se utilizó la transformación \log_2 de la señal absoluta o de la relación tratamiento/control. La normalización dentro de cada *microarray* se llevó a cabo mediante el método LOESS, que supone que la mayoría de los genes en los *microarrays* no se expresan diferencialmente en relación al control. La relación media en \log_2 para cada gen se obtuvo promediando los valores obtenidos para ambas réplicas por *microarray*. Se usaron dos criterios simultáneamente para identificar genes expresados diferencialmente (DEG): (i) genes con relaciones $\log_2 \geq 2$ o ≤ -2 para genes sobre e infraexpresados, respectivamente; y (ii) genes que se desviaron de la hipótesis nula (relación \log_2 media=0) (test-t a $P < 0.05$, después de la corrección de Bonferroni). Para la comparación de las respuestas entre grupos y para agrupar muestras estrechamente relacionadas, los grupos se agruparon usando un método de jerarquía aglomerativa (*agglomerative hierarchy method*), implementado con el paquete *Cluster* en el software estadístico R. Los resultados de la agrupación jerárquica se presentan en un dendrograma. Comparamos la respuesta general para todos los grupos, así como las respuestas basadas en las funciones biológicas de cada gen (*Gene Ontology: GO*). Utilizamos el software Blast2GO

(Conesa *et al.*, 2005) y el sitio web de AmiGO <http://amigo.geneontology.org/amigo/landing> para analizar y estudiar los términos enriquecidos de ontología génica (*Gene Ontology, GO*) en los genes que se expresaron diferencialmente entre grupos. Se realizaron grupos de los DEG involucrados en una función biológica para el agrupamiento jerárquico, los análisis *TreeView* y la generación de mapas de calor utilizando el software *MultiExperiment Viewer (MeV) 4.9*. El enriquecimiento de la vía KEGG se evaluó mediante la Base de Datos de Bioinformática DAVID (Huang *et al.*, 2009) con *Danio rerio* como base ($p < 0,05$). El análisis de la ruta KEGG se realizó para determinar la participación de los DEG en diferentes rutas biológicas. El análisis se realizó para todos los grupos de peces utilizados y para cada grupo vacunado.

2.8. Validación del *microarray* mediante qPCR

Para validar los resultados del *microarray* mediante qPCR, se empleó una versión modificada del procedimiento estratificado aleatorio propuesto por Miron *et al.* (2006), según lo descrito por Millan *et al.* (2011). Se seleccionó un conjunto de 16 genes que cubren el rango de variación en el cambio de proporción (FC) a través de las diferentes condiciones experimentales (entre -5,06 para la quimiocina 20 con motivo C-C con el adyuvante Matrix-Q en el día 1, y 8,49 para la claudina 1 con las microesferas en el día 5). Los FC de estos genes en los 24 *microarrays* se ordenaron por valor de FC (16

genes \times 42 *microarrays* = 672 casos) y se estratificaron teniendo en cuenta tanto el ancho como la abundancia de valores dentro de cada estrato. Los cebadores específicos de los genes utilizados en los ensayos de la qPCR se muestran en la Tabla 1. Se seleccionaron conjuntos de FC al azar dentro de cada estrato, completando 39 casos de los 672 posibles. El factor de elongación 1-alfa se seleccionó entre los genes no regulados y se usó como gen constitutivo para el análisis de la qPCR. Para la qPCR se utilizaron las mismas muestras de ARN que las utilizadas para las hibridaciones de los *microarrays*. La obtención del ADNc a partir del ARN (1 μ g) se llevó a cabo utilizando el kit de síntesis de ADNc de temperatura múltiple AffinityScript, de acuerdo con el protocolo del proveedor (Agilent Technologies). El análisis mediante qPCR se realizó según lo previamente descrito (Millan *et al.*, 2011). Para cada gen, el FC en el nivel de transcripción se determinó mediante el método cuantitativo relativo ($\Delta\Delta$ Ct) (Livak y Schmittgen, 2001).

Genes	Secuencia (5' → 3') directo	Secuencia (5' → 3') reverso
<i>Angiopoietin-related protein 4 precursor</i>	ATGACTTCAGAAGGCGGATG	CTGGCCTTGTGGAGAGAG
<i>Caspase 8</i>	GAGGGGATCAAAGATGCAAA	CCTGTATGCCACAGGGTAG
<i>CC chemokine 3</i>	TGGGAAGACTGGACAAAACC	TTTCTGCCCAGACAAACAT
<i>C-C motif chemokine 20</i>	GCCATTGTCTCCACATTCC	CGATCTGAGCATCTTCCTC
<i>Chemokine (C-C motif) receptor 7</i>	CTCTGTTTCATCAGCGTGGA	AGTAAGGGGTGCAGGTGTTG
<i>Claudin 1</i>	ACGAGAGGACCACCTGTGAG	TGATTCTCCGATCATAGCC
<i>Elongation factor 1-alpha</i>	GGAGGCCAGCTCAAAGATGG	ACAGTTCCAATACCGCCGATT
<i>Fatty acid-binding protein, liver-type</i>	TTGTTGTTTCGCCTCTCCGT	GAGAACGACATAGCGACGGT
<i>Immunoglobulin D heavy chain</i>	AGTAAACCTTCGGCCACCTT	CTCTTGCTTTGTGGGGTTC
<i>Interleukin 17 receptor E</i>	CATAACCTGGTCTGGCACCT	GCGGAGGTGGTAGTTGTGAT
<i>Interleukin 8</i>	CCATCAGTGAAGGGGTGAGT	GAGTGTTTCAGGGTGGAAT
<i>Mannose receptor, C type 1b</i>	AGACAGTGGCTCCTTCCTGA	TATCTCTGTTGCCCCAGAC
<i>MHCII antigen alpha chain</i>	ACACTGTGCCCCCATTTCTC	GAGCAGGTTTTCAACTCCGC
<i>N-deacetylase/N-sulfotransferase</i>	CACGTGCGTATCTCTCCAGT	TGACCCCTTGACCTTTAACC
<i>Suppressor of cytokine signaling 1</i>	GGAGGAGGCACACGACATAC	GCAGATTGAACAGCAGGTTG
<i>TNF-a</i>	CCCTTATCATTATGGCCCTT	TCCGAGTACCGCCATATCCT

Tabla 1. Secuencias de los cebadores para la qPCR.

2.9. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en el ELISA (niveles de IgM específicas en suero) se compararon mediante análisis de varianza (ANOVA) seguido del test de Duncan. Las diferencias se consideraron significativas a $p < 0,05$.

3. Resultados y discusión

3.1. Dinámica celular en la cavidad peritoneal después de la vacunación

Los cuatro adyuvantes indujeron la migración de células a la cavidad peritoneal, aumentando su número el día 1 y luego disminuyendo los días 3 y 5 (Fig. 2). El mayor número de células libres peritoneales se encontró en grupos de peces inyectados con vacunas que contienen Alhydrogel, FCA o microesferas, mientras que Matrix-Q indujo menor migración celular. El número de células movilizadas con la inyección de PBS o con solo el antígeno fue muy bajo, aunque este último indujo una respuesta más alta. Las variaciones en el número de células con el tiempo son causadas por la migración celular a la cavidad peritoneal, así como por la unión de las células peritoneales libres a la pared peritoneal y la migración a los órganos linfomieloides. La unión de las células peritoneales libres, particularmente los fagocitos, al peritoneo visceral y parietal y la migración de estas células a los órganos internos se produjo muy poco después de la inyección, pues se detectaron después de seis horas en el bazo y el riñón (Folgueira *et al.*, 2015).

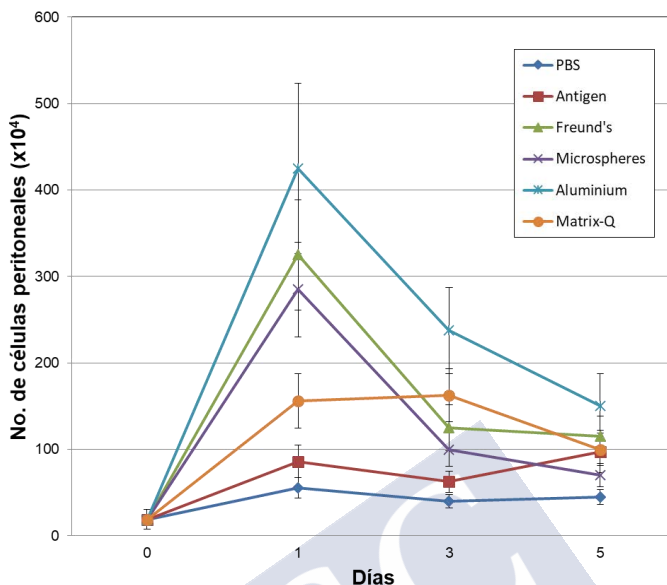


Fig. 2. Número de células libres en la cavidad peritoneal de peces inyectados con PBS, antígeno o con vacunas que contienen antígeno y diferentes adyuvantes, en los días 0, 1, 3 y 5 después de la inyección. Los resultados se presentan como medias \pm desviación estándar; $n=6$ por grupo, con la excepción de los grupos PBS y control 0 h ($n=8$).

3.2. Validación de los *microarrays* mediante qPCR

Se utilizaron un total de 39 casos de 16 genes seleccionados al azar que cubren la mayor parte del rango de FC en el estudio, para validar los datos de los *microarrays* (Tabla 1). El número de casos analizados por gen en diferentes *microarrays* varió de 2 a 4 debido al enfoque de selección aleatoria utilizado. Todos los *microarrays* se validaron utilizando al menos 4 genes, hasta un máximo de 6 genes con un promedio de 5 genes/*microarray*. El factor de elongación 1-

alfa, el gen constitutivo seleccionado, mostró una variación muy baja entre las condiciones experimentales probadas (CV: 0,026). Encontramos alta correlación entre las qPCRs y los valores de expresión de los *microarrays* (coeficiente de Pearson = 0,78; $p = 0$), lo que indica la consistencia de nuestros datos de los *microarrays*, como se encontró en estudios previos en rodaballo (Millan *et al.*, 2010, 2011; Pardo *et al.*, 2012).

3.3. Análisis de los genes que se expresan diferencialmente

En estudios anteriores, encontramos que el número total de células peritoneales libres en el rodaballo alcanza su valor máximo muy pronto después de la inyección de material particulado y, al día 3, la mayoría de las células con material fagocitado ya están adheridas al peritoneo o migran a otras áreas del cuerpo (Noia *et al.*, 2014; Folgueira *et al.*, 2015). En el presente estudio, analizamos esta respuesta temprana (1, 3 y 5 días) en las células peritoneales midiendo los cambios en la expresión génica. Identificamos 374 genes que se expresaron diferencialmente en todos los grupos de peces inyectados con la vacuna (antígeno y adyuvante) o con el antígeno solo y en los tres tiempos seleccionados, en relación con los peces inyectados con PBS (Anexo I). De estos genes, 232 estaban sobreexpresados, 133 estaban infraexpresados y 12 estaban sobre o infraexpresados, según el grupo o el tiempo seleccionado. El número de genes expresados diferencialmente (DEG) varió según el adyuvante utilizado:

microesferas (284), Alhydrogel (255), FCA (234) y Matrix-Q (135) (Fig. 3).

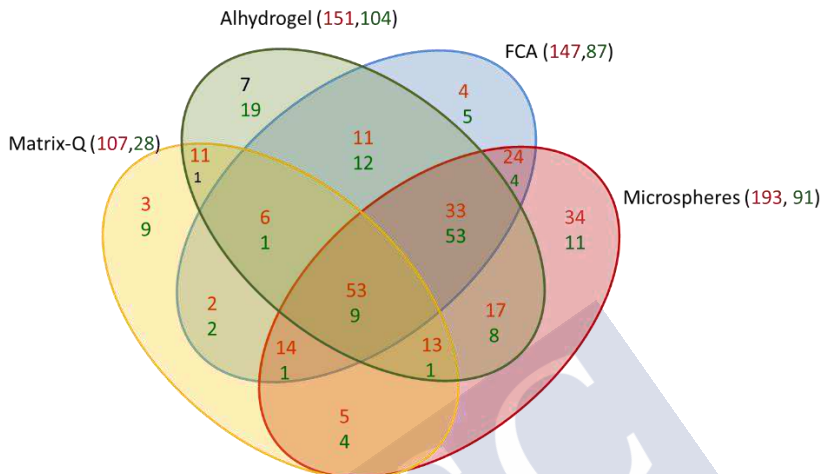


Fig. 3. Diagrama de Venn que muestra el número total de genes sobreexpresados (rojo) e infraexpresados (verde) en las cuatro muestras de antígeno y adyuvantes, en comparación con los grupos inyectados con PBS.

Solo se identificaron 65 genes DEG en células de peces inyectados con solo el antígeno; 12 de estos se sobreexpresan y los otros se infraexpresan, aunque la regulación generalmente se observó en un solo momento. Los términos GO se asignaron a los DEG, que se clasificaron según su función (Fig. 4). Una gran cantidad de genes están involucrados en la adhesión celular (entre el 8,9-14,7% del total, dependiendo del grupo), citoesqueleto de actina (4,2-8,1%), receptores de superficie celular (9,6-12,3%), proliferación celular (11,6-12,3%), respuesta inmunitaria (5,9-10,6%), muerte celular (7,7-10,2%) o migración celular (3,8-5,2%). En comparación, el número de DEG

involucrados en la respuesta inflamatoria no fue particularmente alto (3,4-4,9%). Estimamos la similitud entre pares de grupos tratados con adyuvantes determinando el coeficiente de correlación de Pearson. Encontramos una correlación muy fuerte entre los grupos tratados con FCA, Alhydrogel y microesferas ($>0,98$ para todas las combinaciones). La correlación entre Matrix-Q y los otros adyuvantes fue ligeramente menor, aunque todavía muy alta ($>0,91-0,96$). El análisis de la vía KEGG también mostró que las vías relacionadas con la interacción matriz-receptor extracelular, las moléculas de adhesión celular, la adhesión focal y la regulación del citoesqueleto de actina se encontraban entre las más reguladas (Anexo II), lo que respalda que las células peritoneales libres están sufriendo cambios profundos relacionados con la adhesión celular y el citoesqueleto de actina.

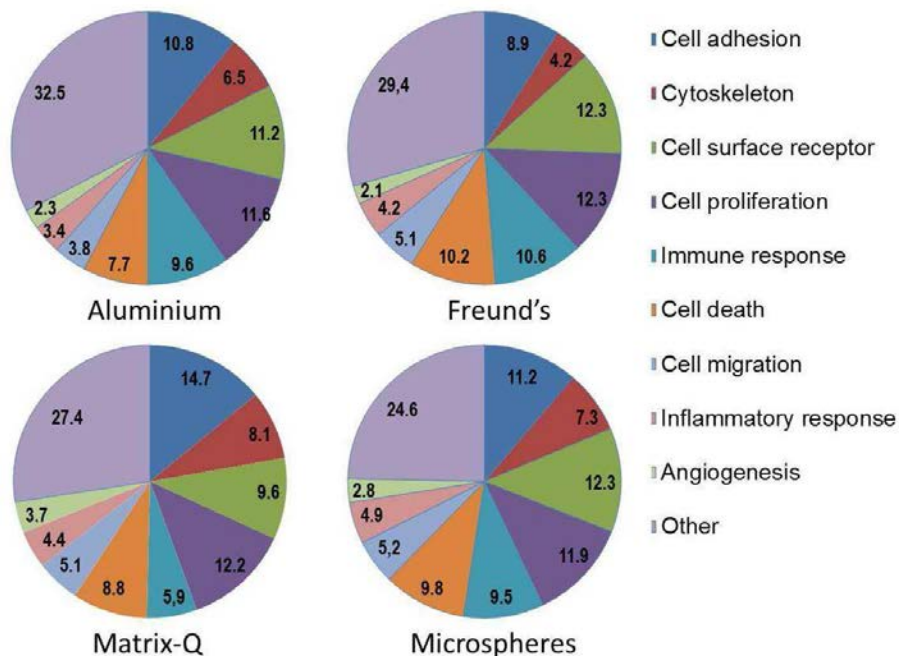


Fig. 4. Gráficos circulares que muestran la proporción (%) de los genes expresados diferencialmente (DEG) por función biológica en células peritoneales de peces vacunados con antígeno y uno de los cuatro adyuvantes probados. Los genes pueden expresarse diferencialmente en uno o más tiempos de muestreo.

3.4. La vacunación incrementa la expresión de genes involucrados en la adhesión celular y en el citoesqueleto de actina

Los adyuvantes evaluados indujeron la expresión diferencial de 42 genes relacionados con las uniones celulares y las uniones focales y/o la organización del citoesqueleto de actina (Fig. 5). De estos, 33 están sobreexpresados y esta sobreexpresión se produjo

principalmente en el día 5, excepto en los grupos inyectados con microesferas, en las que muchos de esos genes también estaban regulados en los días uno y tres. Claudina 1 (*cldn1*), claudina 3A (*cldn3a*), integrina 1-alfa (*itga1*), formina invertida 2 (*inf2*), alfa-parvina (*parva*), sindecán 3 (*sdc3*), *cell adhesion associated oncogene regulated* (*boc*), el *receptor-type tyrosine protein phosphate kappa* (*ptprk*), la cadherina 2 (*cdh2*) y la cadherina-E (*cdh1*) son algunos de los genes que se regulan positivamente en las células peritoneales de todos los grupos de peces inyectados con la vacuna (Fig. 5). El aumento de la expresión de genes relacionados con la adhesión celular se correlacionó con la formación de grupos de células peritoneales en la cavidad peritoneal después de la vacunación, que se observó en todos los grupos de peces vacunados las tres veces seleccionadas (Fig. 6). Las claudinas son proteínas transmembrana que participan en uniones estrechas entre las células epiteliales, pero se ha descrito que participan en uniones estrechas en otros tipos de células, como las células dendríticas (Rescigno *et al.*, 2001) y los macrófagos (Van den Bossche *et al.*, 2012a). Mediante las uniones estrechas, las células dendríticas pueden pasar entre las células epiteliales sin romper la barrera de la unión estrecha. La expresión de *cldn1* se produjo en las células peritoneales de todos los grupos de peces en los días 1, 3 y 5, lo que indica la activación continua de este gen durante varios días. También observamos regulación positiva de *cdh1* el día 5. Aunque *cdh1* se ha asociado con el mantenimiento de la barrera epitelial y la

regulación de la función de las células epiteliales, también se puede expresar en células dendríticas, células de Langerhans y macrófagos (Van den Bossche *et al.*, 2012b). Otros genes involucrados en uniones focales y adherentes, como *itgal*, *boc*, *cdh2*, *ptprk* y la molécula de adhesión celular neural (*ncam*), también se sobreexpresan al día 5 en todos los grupos de peces, lo que indica que los procesos de adhesión celular están fuertemente regulados en las células peritoneales después de vacunación. En estudios anteriores, hemos encontrado que algunas células peritoneales de peces vacunados (especialmente las células similares a los macrófagos) migraron a los órganos linfoides, mientras que otras formaron masas de vacuna y células en la cavidad peritoneal con células unidas entre sí y también al mesotelio (Noia *et al.*, 2014; Folgueira *et al.*, 2015). La generación de uniones estrechas y adherentes puede hacer que los leucocitos interactúen con el mesotelio o con otras células durante la respuesta inflamatoria generada en la cavidad peritoneal. Algunos genes implicados en la adhesión celular estaban ligeramente infraexpresados, por ejemplo, el gen *cd22*. Este gen, que media las interacciones entre las células B, se reguló negativamente en los días uno y tres en los tres grupos, pero no en el grupo inyectado con Matrix-Q, lo que probablemente refleja el escaso número de células B en la cavidad peritoneal de los peces inyectados, relativo a los controles.

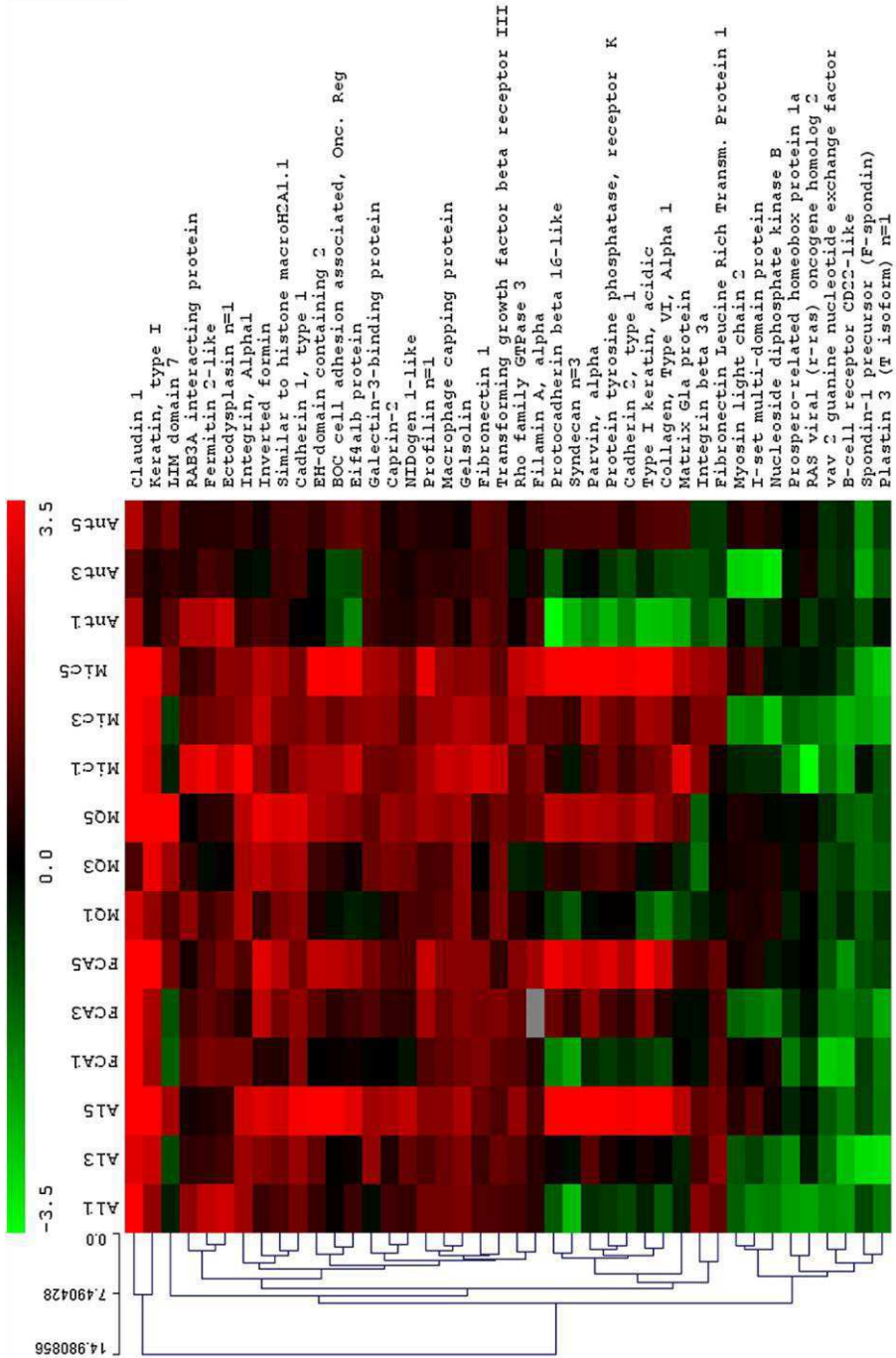
Además de los genes implicados en la adhesión celular, observamos un alto nivel de regulación en genes relacionados con el

citoesqueleto de actina. La regulación de varios genes implicados en el recambio dinámico y la reestructuración del citoesqueleto de actina, como la *inf2*, *parva*, profilina 2 (*pfn2*), gelsolina (*gsn*) y otros, indica que este proceso está altamente estimulado en las células peritoneales después de la inyección de la vacuna. La adhesión, la polarización y la migración ocurren en los leucocitos que migran dentro y fuera del peritoneo de los peces inyectados con la vacuna y estos procesos requieren la reorganización del citoesqueleto de actina. Los genes como *parva* vinculan la adhesión celular con el citoesqueleto de actina y están involucrados en uniones focales que facilitan la asociación entre las integrinas y la actina. El citoesqueleto de actina tiene funciones importantes en las actividades leucocitarias, incluida la señalización celular, la adhesión, la migración y la fagocitosis (Rougerie *et al.*, 2013; Schnoor, 2015) y también es un sensor de estímulos extracelulares y regulador de la activación transcripcional de genes involucrados en otras actividades leucocitarias (Taylor y Halene, 2015). Los profundos cambios en el citoesqueleto que ocurrieron en las células peritoneales libres de peces inmunizados también pueden afectar a otras actividades relacionadas con la activación celular. Además de la migración a los órganos linfoides, la sobreexpresión de muchos genes relacionados con el citoesqueleto y la adhesión celular también pueden estar relacionadas con la formación de las masas de vacuna y células en la cavidad peritoneal y con la unión de esas masas a la pared peritoneal. En estudios

anteriores, hemos encontrado que todos los adyuvantes causaron algunas adherencias internas, aunque fueron más evidentes con FCA y menos evidentes con microesferas, hidróxido de aluminio y Matrix-Q (Noia *et al.*, 2014). Sin embargo, no observamos una relación clara entre los niveles de expresión génica inducidos por los adyuvantes en las células peritoneales y el daño generado en la cavidad. Como se mencionó en el estudio anterior, otras propiedades de los adyuvantes como la viscosidad, pueden tener mayor influencia en el tamaño de las masas de vacuna y células y en la formación de adherencias internas.

Página siguiente:

Fig. 5. Mapa de calor que muestra el agrupamiento jerárquico de los DEG involucrados en la adhesión celular y el citoesqueleto. Los datos son de peces inyectados con antígeno (Ant) o con antígeno más adyuvante (Alhydrogel [Al], Freund [FCA], Matrix-Q [MQ] o microesferas [Mic]), los días 1, 3 y 5 después de la inyección. Los resultados se expresan como la tasa media de expresión (\log_2 de diferentes grupos frente a PBS). El rojo indica mayores niveles de expresión génica; el verde indica niveles disminuidos.



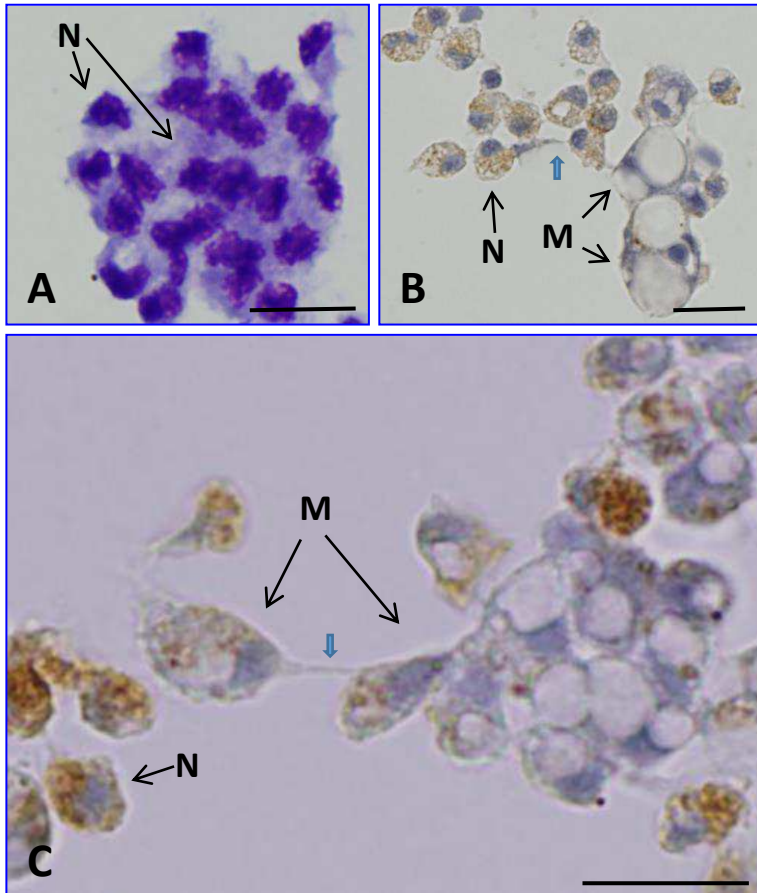


Fig. 6. Células peritoneales de peces vacunados con antígeno y adyuvante de Freund a los 1 (A), 3 (B) y 5 (C) días después de la inyección. Se observaron grupos de neutrófilos (N) o neutrófilos y células similares a macrófagos (M) en la cavidad peritoneal después de la inyección. Algunas células están unidas por extensiones citoplasmáticas (flecha azul). A, Hemacolor; B, C. Peroxidasa-hematoxilina. Barra: 10 m.

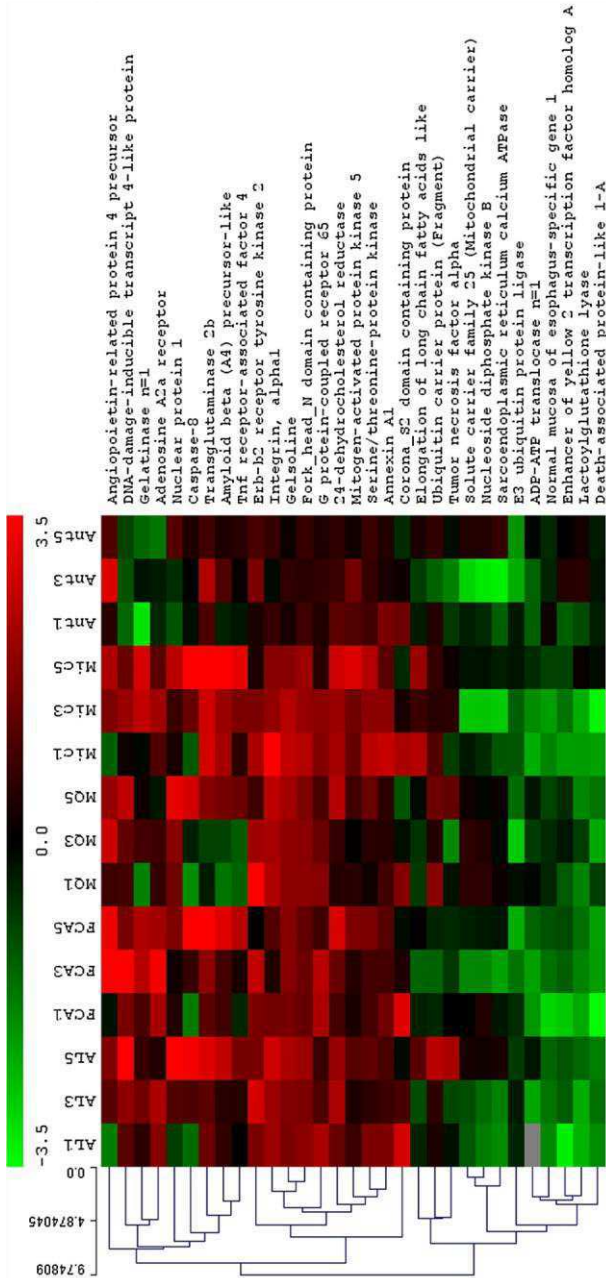
3.5. Regulación de la apoptosis

Treinta y un genes relacionados con la apoptosis se expresaron diferencialmente y seis de estos se sobreexpresaron en todos los grupos, los cuales incluyen principalmente genes que están altamente expresados. Los otros incluyeron 16 genes sobreexpresados y 9 infraexpresados en la mayoría de los grupos, aunque no en todos (Fig.7). Los genes sobreexpresados incluyeron la 24-deshidrocolesterol reductasa (*dhcr24*), la caspasa 8 (*casp8*), el componente 6 del complemento (*c6*), la transglutaminasa 2b (*tg2*), el receptor de ácido retinoico alfa (RARA), la proteína precursora amiloide beta (*a4*) (*aplp1*), el gen *prkc*, *apoptosis*, *wt1*, *regulator* (*pawr*) y el receptor de adenosina A2a (*adora2a*); otros se infraexpresan, incluido el gen que codifica la proteína 1-A asociada a muerte celular (*Dapl1*). Algunos de estos genes tienen un efecto proapoptótico, pero otros son antiapoptóticos, por lo que probablemente se produzcan ambos tipos de señales en los leucocitos peritoneales de los peces vacunados. Los genes con un efecto positivo sobre la apoptosis incluyen la *casp8*, una caspasa iniciadora involucrada en la apoptosis mediada por el receptor de muerte celular estimulado por el ligando Fas o por el factor de necrosis tumoral alfa (*tnfa*) (Mocarski *et al.*, 2011; Monie y Bryant, 2015); *tg2*, un gen multifuncional implicado en la eliminación de células apoptóticas (Nadella *et al.*, 2015) y *rara*, que se ha asociado con la diferenciación de neutrófilos y la apoptosis (Kastner y Chan, 2001). Entre los genes

relacionados con la actividad antiapoptótica, observamos sobreexpresión del gen de la *dhcr24*, un gen que cuando se sobreexpresa puede proteger a las células de la apoptosis inducida por el estrés oxidativo (Lu *et al.*, 2008); *a4*, que retrasa la tasa apoptótica en neutrófilos humanos (Park *et al.*, 2006) y *adora2a*, que induce un retraso en la apoptosis espontánea de neutrófilos humanos (Pliyev *et al.*, 2014). Las vacunas que contienen los mismos adyuvantes que se probaron en el presente estudio indujeron la generación de numerosos neutrófilos apoptóticos en la cavidad peritoneal del rodaballo (Noia *et al.*, 2014). Sin embargo, la migración de neutrófilos inflamatorios desde la cavidad peritoneal a los órganos linfoides después de la inyección de un estímulo inflamatorio se ha descrito en peces (Chaves-Pozo *et al.*, 2005). La presencia de estímulos apoptóticos y antiapoptóticos es necesaria para generar apoptosis en algunas células y para mantener la tasa de apoptosis a ciertos niveles e inducir la migración celular y la liberación de citocinas inflamatorias, como se ha descrito en los mamíferos (Hofman, 2004).

Página siguiente:

Fig. 7. Mapa de calor que muestra la agrupación jerárquica de los DEG involucrados en la apoptosis. Los datos son de peces inyectados con antígeno (Ant), o con antígeno más adyuvante (Alhydrogel [Al], Freund [FCA], Matrix-Q [MQ] o microesferas [Mic]), los días 1, 3 y 5 después de la inyección. Los resultados se expresan como la tasa media de expresión (\log_2 de diferentes grupos frente a PBS). Los diferentes colores indican sobreexpresión (rojo) o infraexpresión (verde).



3.6. Los genes asociados con la actividad y migración de linfocitos se regulan negativamente

Curiosamente, muchos de los genes asociados con los linfocitos y la actividad de los linfocitos se infraexpresan en los grupos inyectados con vacunas que contienen microesferas, FCA y Alhydrogel (Fig. 8). La infraexpresión afectó a un número menor de genes en el grupo inyectado con la vacuna que contiene Matrix-Q. Algunos de los genes regulados negativamente incluyen quimiocinas como la quimiocina *ccl20*, que desempeña un papel importante en el tráfico constitutivo de leucocitos, incluidas las células dendríticas inmaduras y los linfocitos T y B (Zhao *et al.* , 2014) y la quimiocina *ccl4*, la cual participa en la migración de células inmunes y al bloquearla se reduce la migración de células T a los ganglios linfáticos después de la vacunación (Castellino *et al.* , 2006). Los estudios en peces han demostrado que *ccl4* atrae a los leucocitos, induce respuesta inflamatoria e impulsa la diferenciación de linfocitos en la vía Th1 (Hsu *et al.*, 2013). Otros genes infraexpresados incluyen los receptores de quimiocinas *ccr7* y *ccr9*, los cuales se expresan en linfocitos en mamíferos y peces (Kim, 2005; Castro *et al.*, 2014); el factor de transcripción 7 (*T-Cell Specific, HMG-Box*) y el receptor beta de células-T, que se expresan en los linfocitos T. También observamos disminución en la expresión de genes que codifican proteínas expresadas en células B, como el gen *B-Cell CLL/Lymphoma 11A (bc111a-b)*, la inmunoglobulina variable pesada 4-31, la cadena 2ª de

la inmunoglobulina gamma, el *lymphocyte antigen 6 complex, locus G6F*, el receptor de células-B CD22, la cadena pesada de inmunoglobulina M y la cadena alfa de la proteína asociada al complejo receptor de antígeno de células B. Estos resultados indican que los genes relacionados con la actividad de los linfocitos B y T y la migración se inhibieron en las células peritoneales después de la inyección de la vacuna, apoyando lo encontrado por Folgueira *et al.*, 2015. La disminución en la producción de quimiocinas que atraen linfocitos disminuiría la población de estas células y, debido a que hay pocos linfocitos, encontramos una expresión muy baja de sus marcadores. Sin embargo, contrastan con lo encontrado en el bazo de la lubina asiática, donde se observó sobreexpresión de los genes relacionados con los linfocitos el primer día y siete después de la vacunación (Jiang *et al.*, 2014), y con lo observado en trucha arcoiris donde se incrementó el número de linfocitos B IgM⁺ en la cavidad tras la inmunización con diferentes antígenos (Castro *et al.*, 2017). Aunque estas diferencias se discutirán en capítulos siguientes, creemos que pueden deberse a la recogida de la muestra, en función de que contenga más células libres o células formando parte de los cúmulos de células y vacuna. También hemos encontrado diferencias importantes entre las vacunas que contienen Matrix-Q y las vacunas que contienen los otros adyuvantes. Matrix-Q solo indujo la infraexpresión de 4 genes (*ccr7*, *tcf7*, *ccl4*, *ccl20*) y a un nivel mucho más bajo que los otros adyuvantes, lo que indica que este adyuvante

tiene un efecto inhibitor menor sobre la actividad y migración de linfocitos que los otros. En peces inyectados con vacunas que contienen microesferas, FCA o Alhydrogel observamos disminución de la expresión de genes relacionados con la presentación de antígenos, como la cadena alfa del Mhcii (*mhciia*) y la tiol reductasa lisosómica inducible por interferón gamma (*gilt*) (Fig. 8). El gen *gilt* se expresa constitutivamente en células presentadoras de antígeno en mamíferos y cataliza la reducción del enlace disulfuro que puede ser importante para la generación de epitopos de clase II (Phan *et al.*, 2000). El gen *mhciia* también se expresa en las células presentadoras de antígeno, como las células dendríticas, los macrófagos y las células B. El número de macrófagos peritoneales en la cavidad era alto en los tiempos utilizados en este trabajo y en el estudio previo (Folgueira *et al.*, 2015). Sin embargo, estos macrófagos no parecían expresar estos genes durante esta respuesta inflamatoria temprana en la cavidad peritoneal, lo que sugiere que muchos de los macrófagos libres eran MHCII-. La mayoría de los macrófagos inflamatorios durante la peritonitis aguda en ratones fueron MHCII-, mientras que todos los macrófagos migratorios en los ganglios linfáticos fueron MHCII+ (Gautier *et al.*, 2013). Algo similar puede ocurrir en los peces, en los cuales la expresión de *mhciia* puede aumentar durante la migración a los órganos linfoides o en áreas de las masas de vacuna y células.

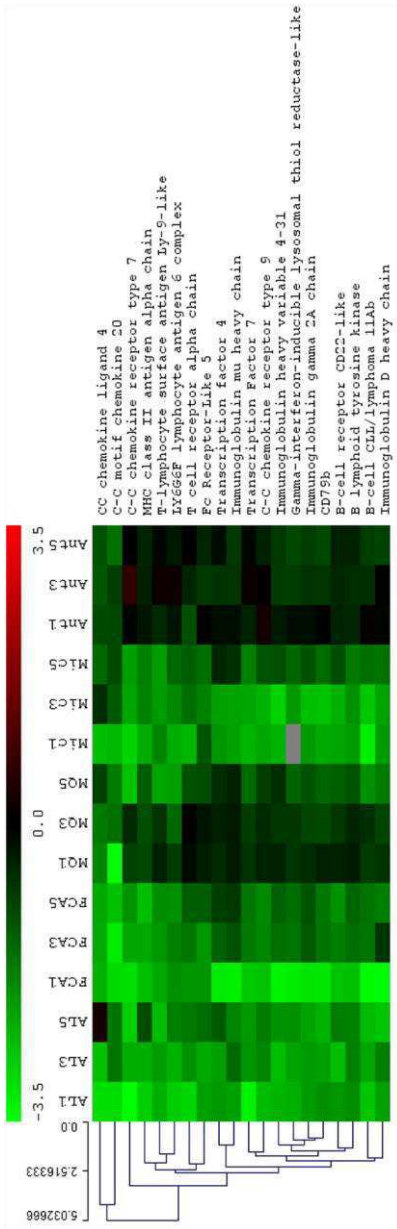


Fig. 8. Mapa de calor que muestra la agrupación jerárquica de los DEG relacionados con la migración y actividad de los linfocitos. Los datos provienen

de peces inyectados con antígeno (Ant) o con antígeno más adyuvante (Alhydrogel [Al], Freund [FCA], Matrix-Q [MQ] o microesferas [Mic]), los días 1, 3 y 5 después de la inyección. Los resultados se expresan como la tasa media de expresión (\log_2 de diferentes grupos frente a PBS). Los diferentes colores indican sobreexpresión (rojo) o infraexpresión (verde).

3.7. Regulación de la respuesta inflamatoria

La vacunación generó cambios en la expresión de varios genes relacionados con la respuesta inflamatoria. Algunos de ellos tuvieron un efecto positivo en la inducción de la inflamación, aunque la mayoría participa en su resolución. La expresión del receptor de la interleucina 6 (*il6r*) aumentó el primer día, excepto en el grupo inyectado con Matrix-Q (Fig. 9). La IL6 exhibe propiedades proinflamatorias y antiinflamatorias, desempeña un papel central en la defensa del hospedador frente a la infección y la lesión tisular y regula de forma diferencial la expresión de quimiocinas inflamatorias, incluidas la interleucina 8 (CXCL8/IL8) y la quimiocina CCL2, así como la migración de neutrófilos a las zonas de inflamación. Sin embargo, la señalización mediada por el receptor de la IL-6 es importante en la resolución de la inflamación y apoya la transición entre la etapa temprana predominantemente neutrofílica de una infección y la afluencia más sostenida en el tiempo de células mononucleares (Hurst *et al.*, 2001). Curiosamente, son pocas las citocinas proinflamatorias que se sobreexpresaron en las células peritoneales de los rodaballos vacunados. La *cxcl8* se sobreexpresó en los grupos inyectados con aluminio o con Matrix-Q y el *tnfa* se

sobreexpresó en un único grupo y solo a un tiempo. El factor 4 asociado al receptor de TNF se sobreexpresó al día 5 en los grupos inyectados con FCA o con microesferas. Sin embargo, también hemos observado regulación de varios genes asociados con la resolución de la respuesta inflamatoria. Este es el caso de *cdh1*, un gen que se sobreexpresó en todos los grupos y que se ha asociado con la activación de macrófagos M2 en mamíferos, induciendo la supresión de la respuesta inflamatoria (Van den Bossche *et al.*, 2012b). Del mismo modo, la regulación positiva de la expresión de *cldn1* se produjo en las células peritoneales de todos los grupos de peces en los días 1, 3 y 5, indicando la activación continua de este gen durante varios días. La expresión de *cldn1* también se ha asociado con macrófagos M2 activados mediante TGF- β (Van den Bossche *et al.*, 2012a). También observamos regulación positiva de *adora2a* en las células de los tres grupos inyectados con vacuna y de la anexina A1 (*anxa1*) en el grupo inyectado con microesferas. La señalización de adenosina promueve la inducción de la activación de M2 a través de receptores de adenosina (Ferrante *et al.*, 2013). ANXA1 es una proteína con potente actividad antiinflamatoria (Perretti y D'Acquisto, 2009). Otro signo de polarización M2 es la sobreexpresión de varios receptores *scavenger* capaces de unirse a una gran variedad de moléculas endógenas y exógenas (Peiser y Gordon, 2001). En el presente estudio, observamos sobreexpresión del receptor *scavenger* clase B, un receptor de LDL, en todos los grupos de peces inyectados

con vacuna y del receptor de la manosa en algunos grupos. Finalmente, también observamos sobreexpresión del *peroxisome proliferator activated receptor gamma (pparg)* en todos los grupos y al primer día. Se ha demostrado que el ligando del PPARG ejerce potentes efectos antiinflamatorios en mamíferos, promoviendo la apoptosis de los neutrófilos y reduciendo la activación inflamatoria de los macrófagos al tiempo que mejora la fagocitosis. Además, PPARG es el miembro principal de la familia PPAR en promover macrófagos M2 (Croasdell *et al.*, 2015).

También observamos infraexpresión de genes relacionados con la presentación de antígenos, como *mchiia*, y de moléculas relacionadas con el procesamiento de antígenos, como *gilt* (Fig. 8). La presentación del antígeno es crucial para la generación de las respuestas protectoras de las células T contra los patógenos y para la activación posterior dependiente de las células T de las células B y para la producción de anticuerpos. La disminución de la presentación del antígeno y una respuesta supresora general también se han asociado con la respuesta de macrófagos M2 (Mosser, 2003), además, ciertas citocinas características de la respuesta M2 también pueden disminuir la expresión de *mhcii* y la presentación del antígeno (de Waal Malefyt *et al.*, 1991). Los macrófagos M2 se pueden dividir en varios fenotipos basados en los perfiles de expresión génica en mamíferos y estos fenotipos parecen estar presentes en los peces (Hodgkinson *et al.*, 2015). El estado de los macrófagos puede ser

inducido por varias citocinas, como IL-4 o IL-13, o los propios macrófagos pueden producir ciertas citocinas como IL-10. Desafortunadamente, esas citocinas no se incluyeron en el *microarray* y, por lo tanto, no fue posible determinar sus niveles de expresión. Por lo tanto, es difícil sugerir qué tipos de macrófagos M2 dominan en esta respuesta. No obstante, el análisis del *microarray* sugiere que la resolución de la reacción inflamatoria ya había comenzado un día después de la inyección en todos los grupos de rodaballos vacunados y que este efecto fue más marcado en el grupo inyectado con microesferas y fue menos evidente en el grupo inyectado con Matrix-Q. La finalización de la inflamación aguda implica el cese del tráfico de neutrófilos, del catabolismo mediador proinflamatorio, de la apoptosis y de la fagocitosis, permitiendo que los tejidos de la zona lesionada reanuden su función fisiológica normal. Se ha observado que la resolución de la inflamación se inicia a las 6 h en mamíferos en respuestas inflamatorias agudas a carragenano y zimosano (Bannenberg *et al.*, 2005). Nuestros resultados indican que este proceso también se puede activar temprano en peces.

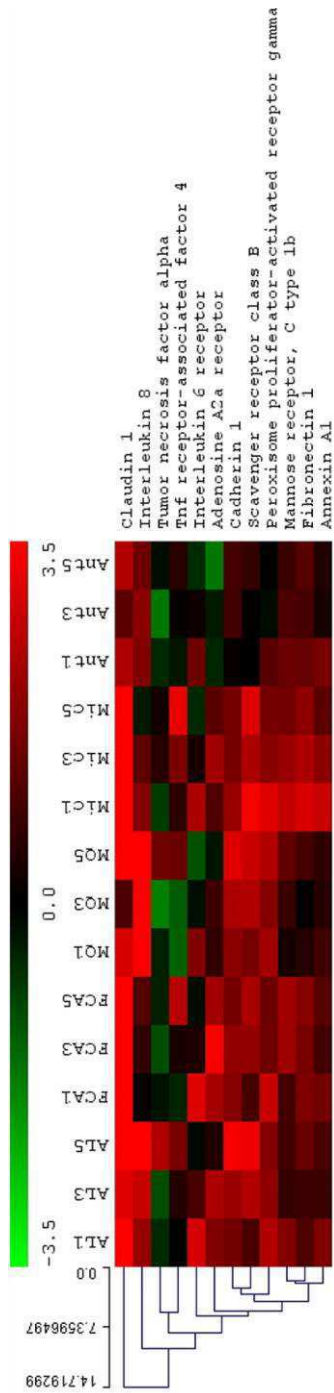
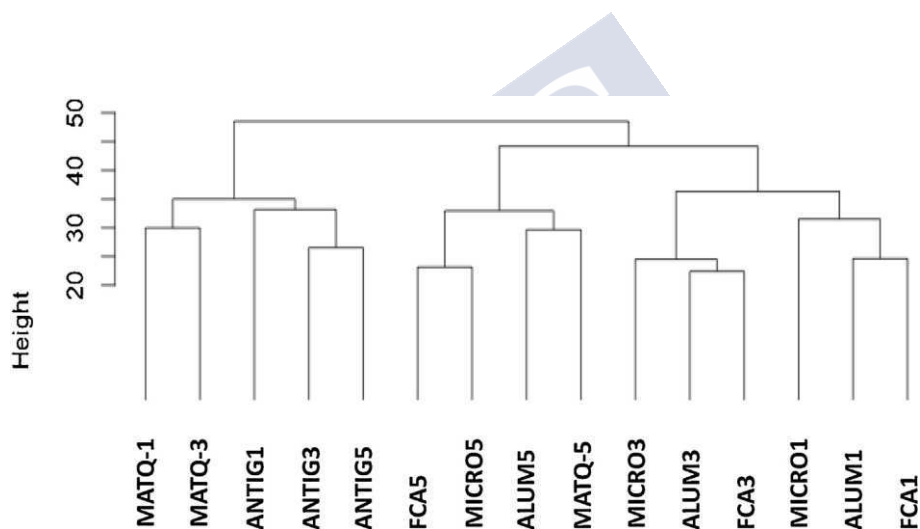


Fig. 9. Mapa de calor que muestra la agrupación jerárquica de los DEG relacionados con la respuesta inflamatoria. Los datos son de peces inyectados con antígeno (Ant), o con antígeno más adyuvante (Alhydrogel [Al], Freund [FCA], Matrix-Q [MQ] o microesferas [Mic]), los días 1, 3 y 5 después de la inyección. Los resultados se expresan como la tasa media de expresión (\log_2 de diferentes grupos frente a PBS). Los diferentes colores indican sobreexpresión (rojo) o infraexpresión (verde).

3.8. Comparación de la expresión génica entre grupos

Comparamos los diferentes grupos vacunados para relacionar los cambios en la actividad de las células peritoneales con la administración de un adyuvante particular. La respuesta general en los grupos inyectados con antígeno fue similar en los tres tiempos de muestreo. Esta respuesta fue también similar a la obtenida con la mezcla antígeno y Matrix-Q a los días 1 y 3. Las respuestas en los otros grupos fueron más dependientes del tiempo después de la infección que del adyuvante administrado (Fig. 10). Al día 5, todas las vacunas adyuvantadas generaron una respuesta similar, aunque los grupos inyectados con microesferas y FCA estaban más estrechamente relacionados que los grupos inyectados con Alhydrogel y Matrix-Q. Curiosamente, este patrón de respuesta fue similar cuando los grupos se compararon en relación con los genes cuya expresión está relacionada con la reorganización del citoesqueleto, la adhesión celular, la apoptosis, la angiogénesis o la migración celular (Figs. 11 y 12). Con la excepción de Matrix-Q, cuya respuesta fue más similar a la respuesta al antígeno solo en los días 1 y 3, las asociaciones

encontradas en los otros grupos se relacionaron principalmente con el tiempo transcurrido desde la inyección y secundariamente con el adyuvante utilizado. La respuesta transcriptómica inducida por el antígeno fue muy baja en comparación con la inducida por el antígeno y el adyuvante, y muy similar a la inducida por PBS, lo que indica que la respuesta generada está más estrechamente relacionada con el adyuvante utilizado que con el antígeno.



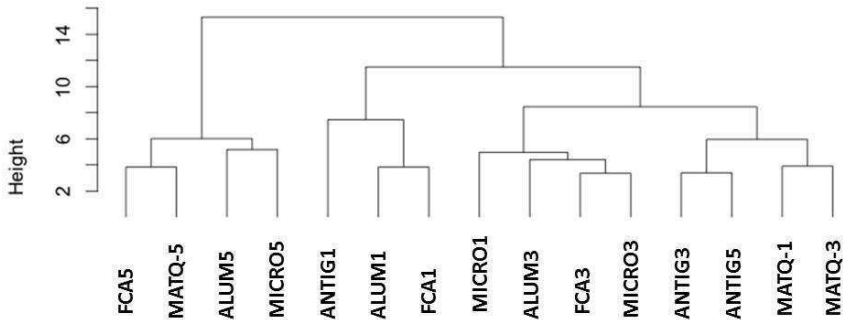


Fig. 11. Dendrograma de agrupamiento jerárquico que muestra la relación entre los grupos de peces inyectados con antígeno o antígeno y adyuvante, teniendo en cuenta todos los DEG relacionados con la organización del citoesqueleto. Antígeno (ANTIG), Matrix-Q (MAT-Q), adyuvante completo de Freund (FCA), microesferas (MICROS), Alhydrogel (ALUM), los días 1, 3 y 5 después de la inyección.

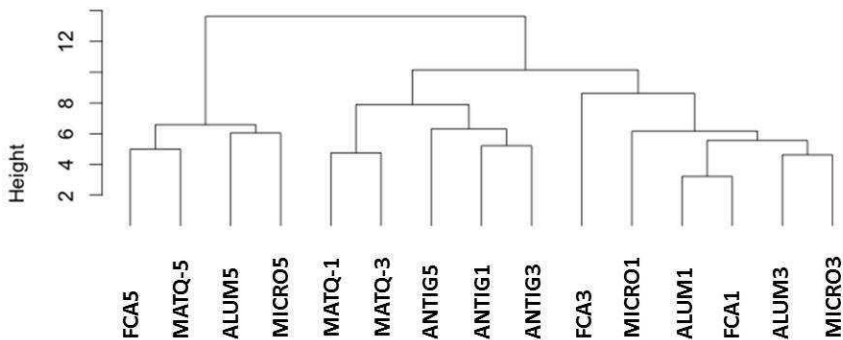


Fig. 12. Dendrograma de agrupamiento jerárquico que muestra la relación entre los grupos de peces inyectados con antígeno o antígeno y adyuvante, teniendo en cuenta todos los DEG relacionados con la apoptosis. Antígeno (ANTIG), Matrix-Q (MAT-Q), adyuvante completo de Freund (FCA), microesferas (MICROS), Alhydrogel (ALUM), los días 1, 3 y 5 después de la inyección.

3.9. Comparación entre la expresión génica en células peritoneales y los niveles de anticuerpos en suero

En paralelo con los *microarrays*, evaluamos las respuestas de anticuerpos generadas en rodaballos después de la vacunación con los mismos antígenos y adyuvantes utilizados en el experimento de expresión génica. El análisis de los *microarrays* mostró que Alhydrogel, Freund y las microesferas inducen migración celular y una respuesta de expresión génica muy similar en las células peritoneales libres. Sin embargo, la respuesta de anticuerpos generada por Freund fue mucho mayor que la inducida por los otros adyuvantes (Fig. 13). Los peces inyectados con Matrix-Q, Alhydrogel o microesferas mostraron niveles de anticuerpos similares, aunque el primero fue menos inflamatorio. Hay varias razones posibles que explican estas discrepancias. La respuesta inmunitaria generada por las vacunas está más estrechamente relacionada con los eventos que tienen lugar en las masas de vacuna y células y en los órganos inmunes que en las células peritoneales libres. Otros efectos, como el efecto depósito (*depot effect*: liberación sostenida del antígeno en el sitio de la inoculación), también son probablemente importantes para generar la producción de anticuerpos, como se ha descrito en los mamíferos (Batista-Duarte *et al.*, 2013).

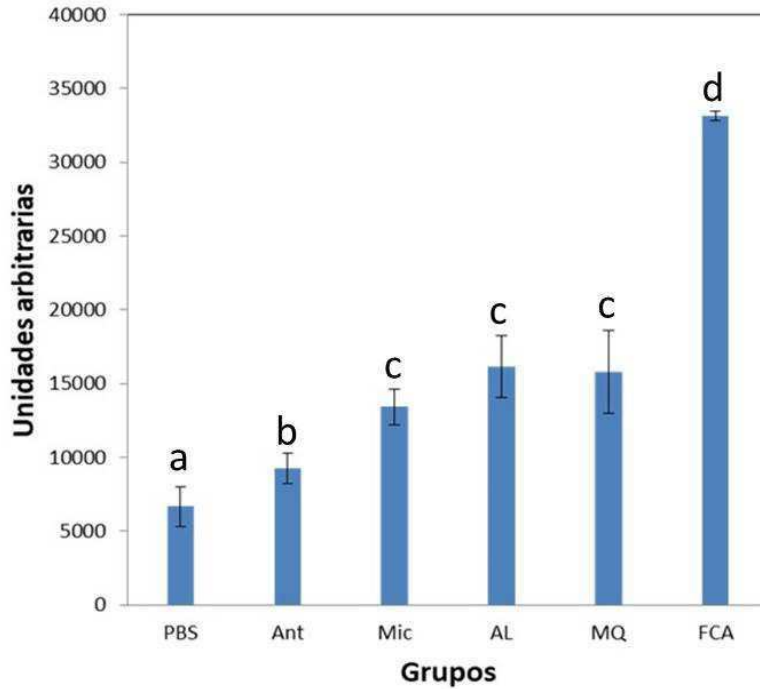


Fig. 13. Niveles de anticuerpos en suero, determinados por ELISA, en rodaballos inyectados con PBS, antígeno de membrana de *P. dicentrarchi* (Ant) o antígeno más microesferas (Mic), Alhydrogel (AL), Matrix-Q (MQ) o adyuvante completo de Freund (FCA). Los resultados se expresan en unidades de quimioluminiscencia y los valores mostrados son medias \pm desviación estándar ($n=10$ peces/ grupo). Los grupos indicados por letras diferentes (a-d) difieren significativamente ($p < 0,05$).

4. Bibliografía

Bannenber, G.L., Chiang, N., Ariel, A., Arita, M., Tjonahen, E., Gotlinger, K.H., Hong, S., Serhan, C.N. (2005). Molecular circuits of resolution, formation and actions of resolvins and

- protectins. *J. Immunol.*, 174: 4345-4355. doi: 10.4049/jimmunol.174.7.4345
- Batista-Duharte, A., Portuondo, D., Carlos, I.Z., Pérez, O. (2013). An approach to local immunotoxicity induced by adjuvanted vaccines. *Int. Immunopharmacol.*, 17: 526-536. doi: 10.1016/j.intimp.2013.07.025
- Behera, T., Swain, P. (2012). Antigen adsorbed surface modified poly-varepsilon-caprolactone microspheres stimulates both adaptive and innate immune response in fish. *Vaccine*, 30: 5278-5284. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.05.028
- Budiño, B., Leiro, J., Cabaleiro, S., Lamas, J. (2012). Characterization of *Philasterides dicentrarchi* isolates that are pathogenic to turbot: serology and cross-protective immunity. *Aquaculture*, 364–365: 130-136. doi: 10.1016/j.aquaculture.2012.08.006
- Castellino, F., Huang, A.Y., Altan-Bonnet, G., Stoll, S., Scheinecker, C., Germain, R.N. (2006). Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8⁺ T cells to sites of CD4⁺ T cell-dendritic cell interaction. *Nature*, 440: 890-895. doi: 10.1038/nature04651
- Castro, R., Bromage, E., Abós, B., Pignatelli, J., Gonzalez Granja, A., Luque, A., Tafalla, C. (2014). CCR7 is mainly expressed in teleost gills, where it defines an IgD⁺IgM⁻ B lymphocyte subset. *J. Immunol.*, 192: 1257-1266. doi: 10.4049/jimmunol.1302471

- Castro, R., Abós, B., González, L., Granja, A.G., Tafalla, C. (2017). Expansion and differentiation of IgM+ B cells in the rainbow trout peritoneal cavity in response to different antigens. *Dev. Comp. Immunol.*, 70: 119-127. doi: 10.1016/j.dci.2017.01.012
- Chaves-Pozo, E., Munoz, P., Lopez-Munoz, A., Pelegrin, P., Garcia Ayala, A., Mulero, V., Meseguer, J. (2005). Early innate immune response and redistribution of inflammatory cells in the bony fish gilthead seabream experimentally infected with *Vibrio anguillarum*. *Cell Tissue Res.*, 320: 61-68. doi: 10.1007/s00441-004-1063-7
- Conesa, A., Gotz, S., Garcia-Gomez, J.M., Terol, J., Talon, M., Robles, M. (2005). Blast2GO, a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21: 3674-3676. doi: 10.1093/bioinformatics/bti610
- Croasdell, A., Duffney, P.F., Kim, N., Lacy, S.H., Sime, P.J., Phipps, R.P. (2015). PPARgamma and the innate immune system mediate the resolution of inflammation. *PPAR Res.*, 2015: 549691. doi: 10.1155/2015/549691
- Dan, X.M., Zhang, T.W., Li, Y.W., Li, A.X. (2013). Immune responses and immune-related gene expression profile in orange-spotted grouper after immunization with *Cryptocaryon irritans* vaccine. *Fish Shellfish Immunol.*, 34: 885-891. doi: 10.1016/j.fsi.2012.12.011

- de Waal Malefyt, R., Haanen, J., Spits, H., Roncarolo, M.G., de Velde, A., Figdor, C., Johnson, K., Kastelein, R., Yssel, H., de Vries, J.E. (1991). Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J. Exp. Med.*, 174: 915-924. doi: 10.1084/jem.174.4.915
- Dominguez, B., Pardo, B.G., Noia, M., Millan, A., Gomez-Tato, A., Martinez, P., Leiro, J., Lamas, J. (2013). Microarray analysis of the inflammatory and immune responses in head kidney turbot leucocytes treated with resveratrol. *Int. Immunopharmacol.*, 15: 588-596. doi: 10.1016/j.intimp.2013.01.024
- Estévez, J., Leiro, J., Santamarina, M.T., Domínguez, J., Ubeira, F.M. (1994). Monoclonal antibodies to turbot (*Scophthalmus maximus*) immunoglobulins: characterization and applicability in immunoassays. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 41(3-4): 353-366. doi: 10.1016/0165-2427(94)90107-4
- Ferrante, C.J., Pinhal-Enfield, G., Elson, G., Cronstein, B.N., Hasko, G., Outram, S., Leibovich, S.J. (2013). The adenosine-dependent angiogenic switch of macrophages to an M2-like phenotype is independent of interleukin-4 receptor alpha (IL-4Ralpha) signaling. *Inflammation*, 36: 921-931. doi: 10.1007/s10753-013-9621-3

- Folgueira, I., Noia, M., Blanco-Abad, V., Mallo, N., Leiro, J., Lamas, J. (2015). Particle size and traffic of phagocytes between the turbot peritoneal cavity and lymphoid organs. *Fish Shellfish Immunol.*, 44: 652-661. doi: 10.1016/j.fsi.2015.03.034
- Fredriksen, B.N., Saevareid, K., McAuley, L., Lane, M.E., Bogwald, J., Dalmo, R.A. (2011). Early immune responses in atlantic salmon (*Salmo salar* L.) after immunization with PLGA nanoparticles loaded with a model antigen and beta-glucan. *Vaccine*, 29: 8338-8349. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.08.087
- Gautier, E.L., Ivanov, S., Lesnik, P., Randolph, G.J. (2013). Local apoptosis mediates clearance of macrophages from resolving inflammation in mice. *Blood*, 122: 2714-2722. doi: 10.1182/blood-2013-01-478206
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M.S. (2012). Poly d,l-lactide-co-glycolic acid (PLGA)-encapsulated vaccine on immune system in *Epinephelus bruneus* against *Uronema marinum*. *Exp. Parasitol.*, 131: 325-332. doi: 10.1016/j.exppara.2012.04.017
- He, P., Zou, Y., Hu, Z. (2015). Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. *Hum. Vaccines Immunother.*, 11: 477-488. doi: 10.1080/21645515.2014.1004026

- Hodgkinson, J.W., Grayfer, L., Belosevic, M. (2015). Biology of bony fish macrophages. *Biology (Basel)*, 4: 881-906. doi: 10.3390/biology4040881.
- Hofman, P. (2004). Molecular regulation of neutrophil apoptosis and potential targets for therapeutic strategy against the inflammatory process. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*, 3: 1-9. doi: 10.2174/1568010043483935
- Hsu, Y.J., Hou, C.Y., Lin, S.J., Kuo, W.C., Lin, H.T., Lin, J.H. (2013). The biofunction of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) CC chemokine ligand 4 (CCL4) in innate and adaptive immunity. *Fish Shellfish Immunol.*, 35: 1891-1898. doi: 10.1016/j.fsi.2013.09.020
- Huang da, W., Sherman, B.T., Lempicki, R.A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.*, 4: 44-57. doi: 10.1038/nprot.2008.211
- Hurst, S.M., Wilkinson, T.S., McLoughlin, R.M., Jones, S., Horiuchi, S., Yamamoto, N., Rose-John, S., Fuller, G.M., Topley, N., Jones, S.A. (2001). Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity*, 14: 705-714. doi: 10.1016/s1074-7613(01)00151-0
- Jaafar, R.M., Chettri, J.K., Dalsgaard, I., Al-Jubury, A., Kania, P.W., Skov, J., Buchmann, K. (2015). Effects of adjuvant montanide

- ISA 763A VG in rainbow trout injection vaccinated against *Yersinia ruckeri*. *Fish Shellfish Immunol.*, 47: 797-806. doi: 10.1016/j.fsi.2015.10.023
- Jiang, J., Miyata, M., Chan, C., Ngoh, S.Y., Liew, W.C., Saju, J.M., Ng, K.S., Wong, F.S., Lee, Y.S., Chang, S.F., Orbán, L. (2014). Differential transcriptomic response in the spleen and head kidney following vaccination and infection of asian seabass with *Streptococcus iniae*. *PLoS One*, 9: e99128. doi: 10.1371/journal.pone.0099128
- Jiao, X.D., Cheng, S., Hu, Y.H., Sun, L. (2010). Comparative study of the effects of aluminum adjuvants and Freund's incomplete adjuvant on the immune response to an *Edwardsiella tarda* major antigen. *Vaccine*, 28: 1832-1837. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.11.083
- Kastner, P., Chan, S. (2001). Function of RARalpha during the maturation of neutrophils. *Oncogene*, 20: 7178-7185. doi: 10.1038/sj.onc.1204757
- Kiernan, J.A. (1981). *Histological and Histochemical Methods*. Pergamon Press, Oxford.
- Kim, C.H. (2005). The greater chemotactic network for lymphocyte trafficking: chemokines and beyond. *Curr. Opin. Hematol.*, 12: 298-304. doi: 10.1097/01.moh.0000166496.18773.e3
- Kumari, J., Bogwald, J., Dalmo, R.A. (2013). Vaccination of atlantic salmon, *Salmo salar* L., with *Aeromonas salmonicida* and

- infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) showed a mixed Th1/Th2/Treg response. *J. Fish Dis.*, 36: 881-886. doi: 10.1111/jfd.12100
- Leon-Rodriguez, L., Luzardo-Alvarez, A., Blanco-Mendez, J., Lamas, J., Leiro, J. (2012). A vaccine based on biodegradable microspheres induces protective immunity against scuticociliatosis without producing side effects in turbot. *Fish Shellfish Immunol.*, 33: 21-27. doi: 10.1016/j.fsi.2012.03.028
- Leon-Rodriguez, L., Luzardo-Alvarez, A., Blanco-Mendez, J., Lamas, J., Leiro, J. (2013). Biodegradable microparticles covalently linked to surface antigens of the scuticociliate parasite *P. dicentrarchi* promote innate immune responses *in vitro*. *Fish Shellfish Immunol.*, 34: 236-243. doi: 10.1016/j.fsi.2012.10.029
- Lillehaug, A. (2014). Vaccination strategies and procedures. En: *Fish Vaccination*. Gudding, R., Lillehaug, A., Evensen, O. (eds.), John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta C(T)) method. *Methods*, 25: 402-438. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Lu, X., Kambe, F., Cao, X., Kozaki, Y., Kaji, T., Ishii, T., Seo, H. (2008). 3beta-hydroxysteroid-delta24 reductase is a hydrogen peroxide scavenger, protecting cells from oxidative stress-

- induced apoptosis. *Endocrinology*, 149: 3267-3273. doi: 10.1210/en.2008-0024
- Millán, A., Gómez-Tato, A., Fernández, C., Pardo, B.G., Alvarez-Dios, J.A., Calaza, M., Bouza, C., Vázquez, M., Cabaleiro, S., Martínez, P. (2010). Design and performance of a turbot (*Scophthalmus maximus*) oligo-microarray based on ESTs from immune tissues. *Mar. Biotechnol. (NY)*, 12: 452-465. doi: 10.1007/s10126-009-9231-0
- Millán, A., Gómez-Tato, A., Pardo, B.G., Fernández, C., Bouza, C., Vera, M., Alvarez-Dios, J.A., Cabaleiro, S., Lamas, J., Lemos, M.L., Martínez, P. (2011). Gene expression profiles of the spleen liver, and head kidney in turbot (*Scophthalmus maximus*) along the infection process with *Aeromonas salmonicida* using an immune-enriched oligo-microarray. *Mar. Biotechnol. (NY)*, 13: 1099-1114. doi: 10.1007/s10126-011-9374-7
- Miron, M., Woody, O.Z., Marcil, A., Murie, C., Sladek, R., Nadon, R. (2006). A methodology for global validation of microarray experiments. *BMC Bioinf.*, 7: 333. doi: 10.1186/1471-2105-7-333
- Mocarski, E.S., Upton, J.W., Kaiser, W.J. (2011). Viral infection and the evolution of caspase 8-regulated apoptotic and necrotic death pathways. *Nat. Rev. Immunol.*, 12: 79-88. doi: 10.1038/nri3131

- Monie, T.P., Bryant, C.E. (2015). Caspase-8 functions as a key mediator of inflammation and pro-IL-1 β processing via both canonical and non-canonical pathways. *Immunol. Rev.*, 265: 181-193. doi: 10.1111/imr.12284.
- Mosser, D.M. (2003). The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.*, 73: 209-212. doi: 10.1189/jlb.0602325
- Mostowy, S., Shenoy, A.R. (2015). The cytoskeleton in cell-autonomous immunity: structural determinants of host defence. *Nat. Rev. Immunol.*, 15: 559-573. doi: 10.1038/nri3877
- Mutoloki, S., Cooper, G.A., Marjara, I.S., Koop, B.F., Evensen, O. (2010). High gene expression of inflammatory markers and IL-17A correlates with severity of injection site reactions of atlantic salmon vaccinated with oil-adjuvanted vaccines. *BMC Genomics*, 11: 336. doi: 10.1186/1471-2164-11-336
- Nadella, V., Wang, Z., Johnson, T.S., Griffin, M., Devitt, A. (2015). Transglutaminase 2 interacts with syndecan-4 and CD44 at the surface of human macrophages to promote removal of apoptotic cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1853: 201-212. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.09.020
- Noia, M., Dominguez, B., Leiro, J., Blanco-Mendez, J., Luzardo-Alvarez, A., Lamas, J. (2014). Inflammatory responses and side effects generated by several adjuvant-containing vaccines in turbot. *Fish Shellfish Immunol.*, 38: 244-254. doi: 10.1016/j.fsi.2014.03.020

- Pardo, B.G., Millán, A., Gómez-Tato, A., Fernández, C., Bouza, C., Alvarez-Dios, J.A., Cabaleiro, S., Lamas, J., Leiro, J.M., Martínez, P. (2012). Gene expression profiles of spleen liver, and head kidney in turbot (*Scophthalmus maximus*) along the infection process with *Philasterides dicentrarchi* using an immune-enriched oligo-microarray. *Mar. Biotechnol. (NY)*, 14: 570-582. doi: 10.1007/s10126-012-9440-9
- Park, H.Y., Park, J.I., Baek, D.W., Lee, S.Y., Lee, M.J., Jin, J.O., Kim, J.W., Hong, Y.S., Lee, Y.H., Kwak, J.Y. (2006). Modulation of neutrophil apoptosis by beta-amyloid proteins. *Int. Immunopharmacol.*, 6: 1061-1069. doi: 10.1016/j.intimp.2006.01.019
- Peiser, L., Gordon, S. (2001). The function of scavenger receptors expressed by macrophages and their role in the regulation of inflammation. *Microbes Infect.*, 3: 149-159. doi: 10.1016/S1286-4579(00)01362-9
- Perretti, M., D'Acquisto, F. (2009). Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 9: 62-70. doi: 10.1038/nri2470
- Phan, U.T., Arunachalam, B., Cresswell, P. (2000). Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT). Maturation, activity, and mechanism of action. *J. Biol. Chem.*, 275: 25907-25914. doi: 10.1074/jbc.M003459200

- Piazzon, C., Lamas, J., Castro, R., Budino, B., Cabaleiro, S., Sanmartin, M., Leiro, J. (2008). Antigenic and cross-protection studies on two turbot scuticociliate isolates. *Fish Shellfish Immunol.*, 25: 417-424. doi: 10.1016/j.fsi.2008.05.012
- Pliyev, B.K., Dimitrieva, T.V., Savchenko, V.G. (2014). Diadenosine diphosphate (ap(2)A) delays neutrophil apoptosis via the adenosine A2A receptor and cAMP/PKA pathway. *Biochem. Cell. Biol.*, 92: 420-424. doi: 10.1139/bcb-2014-0059
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.P., Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.*, 2: 361-367. doi: 10.1038/86373
- Ribas, L., Pardo, B.G., Fernandez, C., Alvarez-Dios, J.A., Gomez-Tato, A., Quiroga, M.I., Planas, J.V., Sitja-Bobadilla, A., Martinez, P., Piferrer, F. (2013). A combined strategy involving sanger and 454 pyrosequencing increases genomic resources to aid in the management of reproduction, disease control and genetic selection in the turbot (*Scophthalmus maximus*). *BMC Genomics*, 14: 180. doi: 10.1186/1471-2164-14-180
- Rougerie, P., Miskolci, V., Cox, D. (2013). Generation of membrane structures during phagocytosis and chemotaxis of macrophages. Role and regulation of the actin cytoskeleton. *Immunol. Rev.*, 256: 222-239. doi: 10.1111/imr.12118

- Schnoor, M. (2015). Endothelial actin-binding proteins and actin dynamics in leukocyte transendothelial migration. *J. Immunol.*, 194: 3535-3541. doi: 10.4049/jimmunol.1403250
- Tafalla, C., Bogwald, J., Dalmo, R.A. (2013). Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: current knowledge and future perspectives. *Fish Shellfish Immunol.*, 35: 1740-1750. doi: 10.1016/j.fsi.2013.02.029
- Taylor, A., Halene, S. (2015). The regulatory role of serum response factor pathway in neutrophil inflammatory response. *Curr. Opin. Hematol.*, 22: 67-73. doi: 10.1097/MOH.0000000000000099
- Van den Bossche, J., Laoui, D., Morias, Y., Movahedi, K., Raes, G., De Baetselier, P., Van Ginderachter, J.A. (2012a). Claudin-1, claudin-2 and claudin-11 genes differentially associate with distinct types of anti-inflammatory macrophages in vitro and with parasite- and tumour-elicited macrophages in vivo. *Scand. J. Immunol.*, 75: 588-598. doi: 10.1111/j.1365-3083.2012.02689.x
- Van den Bossche, J., Malissen, B., Mantovani, A., De Baetselier, P., Van Ginderachter, J.A. (2012b). Regulation and function of the E-cadherin/catenin complex in cells of the monocyte-macrophage lineage and DCs. *Blood*, 119: 1623-1633. doi: 10.1182/blood-2011-10-384289

Zhao, L., Xia, J., Wang, X., Xu, F. (2014). Transcriptional regulation of CCL20 expression. *Microbes Infect.*, 16: 864-870. doi: 10.1016/j.micinf.2014.08.005



CAPÍTULO II

**RESPUESTA HUMORAL EN EL BAZO
DURANTE LA VACUNACIÓN CON**

Philasterides dicentrarchi



Respuesta humoral en el bazo durante la vacunación con *Philasterides dicentrarchi*

1. Introducción

La vacunación por inyección genera la mejor respuesta inmunitaria y la mayor protección en peces (Lillehaug, 2014; Li *et al.*, 2015), siendo el único método efectivo contra numerosos patógenos. Este método ha sido usado con éxito en vacunas desarrolladas contra el ciliado parásito *Philasterides dicentrarchi*, un escuticociliado que infecta a peces cultivados causando elevadas mortalidades, generando niveles altos de anticuerpos específicos en suero y una buena protección en el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) (Lamas *et al.*, 2008). Esta protección se ha asociado con la activación de la vía clásica del complemento después de la interacción de los anticuerpos con el parásito (Leiro *et al.*, 2008; Piazzon *et al.*, 2011).

El bazo se considera el órgano periférico linfoide más importante en teleósteos. En el bazo de mamíferos se distinguen dos zonas, denominadas pulpa roja y pulpa blanca. Esta última es una estructura altamente organizada, formada por tejido linfoide en el que se lleva a cabo la expansión clonal de células, la hipermutación somática (SHM) y el cambio de isotipo de células B activadas (Mebius y Kraal, 2005). El bazo de los teleósteos presenta los mismos elementos básicos que el de los mamíferos: vasos sanguíneos, elipsoides, pulpa blanca y pulpa roja, aunque no existe una distinción

clara entre pulpa blanca y pulpa roja (Van Muiswinkel *et al.*, 1991). Además, el tejido linfoide está poco desarrollado en este órgano y aparece rodeando a pequeñas arterias, asociado a centros melanomacrofágicos (MMCs) y difuso por todo el parénquima esplénico (Zapata *et al.*, 1996).

Hasta ahora se han identificado tres tipos de inmunoglobulinas en teleósteos, denominadas IgM, IgD e IgT (Mashoof y Criscitiello, 2016; Stosik *et al.*, 2018). La IgM es la inmunoglobulina más abundante en el plasma y las células IgM⁺ son la mayor población de células B presentes en la circulación sistémica (Mutoloki *et al.*, 2014). Numerosos estudios han puesto de manifiesto la relevancia de esta inmunoglobulina en la destrucción del patógeno, opsonización y activación del complemento en peces (Stosik *et al.*, 2018). Estas células se encuentran en el riñón, bazo, sangre, hígado, tejido adiposo y en las superficies mucosas (Abós *et al.*, 2013). Durante infecciones experimentales se observó un aumento de las células IgM⁺ presentes alrededor de los MCC del bazo (Falk *et al.*, 1995; Bermúdez *et al.*, 2006). Sin embargo, se sabe poco de como las poblaciones de células IgM⁺ responden a la inmunización en órganos internos y, particularmente, en el bazo.

El conocimiento acerca de la IgD de peces es escaso. En base a la presencia de esta inmunoglobulina, se han identificado tres tipos de linfocitos B (IgM⁺/IgD⁻, IgM⁺/IgD⁺ y IgM⁻/IgD⁺) (Edholm *et al.*, 2010; Abós *et al.*, 2018). En trucha arcoíris se ha descrito un nuevo

tipo de IgD^+IgM^- en relación a la expresión del receptor de quimiocina CCR7 (Castro *et al.*, 2014). Aunque algunos estudios han mostrado variaciones en el nivel de transcritos de IgD en los órganos linfoides de peces vacunados (Xu *et al.*, 2017), el papel de esta inmunoglobulina en la defensa del pez aún está por determinar.

La IgT de teleósteos se ha asociado principalmente a la respuesta inmunitaria en la mucosa, sugiriendo que juega un papel en la defensa contra bacterias, virus y parásitos (Zhang *et al.*, 2010; Salinas *et al.*, 2011; Ballesteros *et al.*, 2013; Parra *et al.*, 2016; Buonocore *et al.*, 2017; Zwollo *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2018). Se ha encontrado IgT en el moco y en el suero. La trucha arcoíris tiene una concentración de IgT de aproximadamente 7 y 4 $\mu\text{g/ml}$ en el moco intestinal y el suero, respectivamente (Parra *et al.*, 2016). El origen de la IgT mucosa no se ha descrito en peces, pero la presencia de un receptor de Ig polimérico en las células epiteliales de la piel, la nariz y las branquias sugiere que este receptor está involucrado en el transporte de IgM e IgT a las mucosas (Parra *et al.*, 2016). Como están relacionadas con la inmunidad de mucosas, se han descrito células IgT^+ en las branquias, la piel, el intestino y el epitelio nasal, pero también en órganos internos como el bazo o el riñón (Zhang *et al.*, 2010; Castro *et al.*, 2013; Picchiatti *et al.*, 2017; Zwollo *et al.*, 2017; Abós *et al.*, 2018). Estas células migran a las mucosas durante la infección con virus, bacterias o parásitos (Ballesteros *et al.*, 2013; Buonocore *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2018). La inmunización por baño

indujo un aumento en los niveles de IgT y las células B IgT⁺ en las mucosas (Ballesteros *et al.*, 2013; Hoare *et al.*, 2017). Sin embargo, las células B IgT⁺ se han descrito también en órganos linfoides secundarios como el bazo. En la lubina (*Dicentrarchus labrax*), aproximadamente el 4% de las células del bazo son células B IgT⁺ (Picchietti *et al.*, 2017) y en trucha se ha determinado que alrededor de un 25% de las células B del bazo son IgT⁺ (Zhang *et al.*, 2010; Castro *et al.*, 2013), lo que sugiere que este tipo de células también puede ser importante en la respuesta sistémica. Sin embargo, la información sobre el papel de la IgT en las respuestas inmunes sistémicas es escaso; a pesar de que algunos estudios han encontrado variaciones en la expresión de *igt* en los órganos internos después de la vacunación intraperitoneal (Du *et al.*, 2016; Tang *et al.*, 2018) o en el número de células IgT⁺ en respuesta a infecciones experimentales con virus (Castro *et al.*, 2013).

Los centros melanomacrófágicos (MMCs) son agregados de macrófagos que contienen pigmentos y están presentes principalmente en los órganos linfoides de los peces, pero también aparecen en reptiles y anfibios (Zapata y Cooper, 1990; Steinel y Bolnick, 2017). En los peces, la morfología de los MMCs es bastante variable, describiéndose como una estructura desorganizada que contiene muy pocas células linfoides en ciertos grupos de peces, como los salmónidos (Roberts, 1975; Agius y Roberts, 2003), o como una estructura organizada discreta limitada por una cápsula de células

aplanadas y rodeada de tejido linfóide, como en rodaballo (Ferguson, 1976). Los MMCs se han relacionado con el ayuno, el estrés, la contaminación del agua, las enfermedades y también con los mecanismos de defensa (Zapata y Cooper, 1990; Steinel y Bolnick, 2017). Estas estructuras responden a la inmunización con distintos antígenos. En el carpín dorado (*Carassius auratus*) inmunizados se observó un aumento en el tamaño y en el número de MMCs esplénicos del riñón anterior (Herráez y Zapata, 1986). Varios autores han observado la presencia de antígeno dentro de los MMCs o cerca de ellos después de inmunizaciones experimentales (Ellis, 1980; Lamers y De Haas, 1985; Herráez y Zapata, 1986). Se ha sugerido que los MMCs podrían ser análogos de los centros germinales de mamíferos (ver revisión de Steinel y Bolnick, 2017). Los centros germinales (GC) son estructuras presentes en mamíferos y aves descritos por primera vez por Walther Flemming hace más de 100 años (Allen *et al.*, 2007). Estos son compartimentos complejos ricos en células B, donde se produce proliferación clonal, diferenciación celular, hipermutación somática y cambio de clase de inmunoglobulina (Mesin *et al.*, 2016). Se conoce muy poco sobre los MMCs de peces, especialmente sobre el tejido linfóide asociado a estos centros. Parece claro que, si utilizamos la definición de MMC como agrupaciones de macrófagos, sin tener en cuenta el tejido linfóide asociado, no es posible establecer analogías entre ellos y los centros germinales. El rodaballo podría ser un buen modelo para

estudiar los MMCs, por estar formado por melanomacrófagos agrupados, con una organización clara y con abundante tejido linfoide a su alrededor.

En este estudio, se ha analizado cómo la inmunización intraperitoneal podría afectar a la respuesta inmunitaria que se genera en el bazo del rodaballo (*S. maximus*), cómo afecta a la expresión génica y a las poblaciones de células B, y, finalmente, qué cambios produce en los MMCs y el tejido linfoide asociado.

2. Material y métodos

2.1. Animales de experimentación

Los rodaballos, de aproximadamente 60 g de peso, se obtuvieron de una piscifactoría local y se transfirieron al acuario de la Universidad de Santiago de Compostela, donde se aclimataron en tanques de 250 l en agua marina en recirculación a 17 °C, alimentándose diariamente con piensos comerciales. Todos los protocolos experimentales realizados en el presente estudio siguieron la legislación europea (Directiva 2010/63/UE), los requisitos legislativos españoles relacionados con el uso de animales para experimentación (RD 53/2013) y fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Santiago de Compostela. Los peces se anestesiaron por inmersión en una disolución 100 mg/l de tricaina metano sulfonato (MS-222) (Sigma-Aldrich) en agua de mar. La eutanasia se llevó a cabo por decapitación.

2.2. Vacunación

La vacuna se elaboró según lo descrito por Lamas et al. (2008), con ligeras modificaciones. En resumen, cuatro grupos de peces (72 peces por grupo) y se inyectaron intraperitonealmente con uno de los siguientes tratamientos: 0,1 ml de PBS, antígeno *P. dicentrarchi* inactivado con formalina (0,2%) y PBS (10^6 ciliados ml^{-1}), adyuvante (Montanide ISA 763 A VG; Seppic, París, Francia) y PBS (50:50) o antígeno de conjuntamente con adyuvante (50:50). Después de 30 días, se les administró una dosis de refuerzo. Los peces fueron muestreados a 6 h, 3 d, y 7 d después de la primera dosis, así como a 3d, 7d y 30 d después de la revacunación. Además, un grupo control de 4 peces se empleó para analizar las poblaciones de células B IgM^+ , IgD^+ e IgT^+ por inmunofluorescencia.

2.3. Cultivo de *P. dicentrarchi* e infección experimental

El parásito *P. dicentrarchi* (aislado II) se obtuvo a partir del líquido ascítico de rodaballos infectados de forma natural y mantenidos y cultivados en el laboratorio, según lo descrito previamente por Piazzon *et al.* (2008). Se llevó a cabo una infección experimental en rodaballos a los 30 días de la segunda inyección, utilizando 10 peces de los grupos PBS y Vacuna. Para la infección, los peces se inyectaron intraperitonealmente con 100 μl de ciliados en PBS (10^6 ciliados/ml). La mortalidad se siguió durante 16 días y los peces supervivientes se muestrearon a los 21 de la infección.

2.4. Toma de muestras

Con el objetivo de determinar los efectos de la vacunación en los niveles de anticuerpos del suero, se obtuvieron muestras de sangre de 8 peces por cada tiempo de muestreo a los días 37 y 60 de la primera vacunación mediante punción en la vena caudal. Se dejaron a coagular durante 16 h a 4 °C. Finalmente, la sangre se centrifugó a 4000 g durante 10 min y se recogió el suero.

Después de extraer sangre, los peces se perfundieron intracardiamente con solución de Ringer (1,7% NaCl, 0,024% KCl, 0,031% CaCl₂, 0,044% MgCl₂, 0,113% Na₂SO₄, y 0,049% NaCO₃H, pH 7,4) que contenía 0,1% de procaína, durante aproximadamente 5 minutos. A continuación, se extrajeron los órganos y la mitad de cada uno se procesó para histología/inmunofluorescencia y la otra mitad, para expresión génica. Para histología/inmunofluorescencia, las muestras se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS 0,1 M durante toda la noche a 4 °C. Todos los órganos se lavaron dos veces en PBS durante 24 h a 4 °C, se crioprotegieron con sacarosa al 30% en PBS, se embebieron en compuesto OCT (Tissue Tek) y se congelaron en un baño de isopentano enfriado por nitrógeno líquido. Las secciones, de 2-4 µm de grosor, se obtuvieron en un criostato y se colocaron sobre portaobjetos StarFrost (Waldemar Knittel), tras lo que se guardaron a -20 °C. El medio bazo restante se congeló en nitrógeno líquido y se guardó en un congelador de -80 °C para su posterior procesado. Esta mitad se empleó para analizar la expresión génica mediante reacción

en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real (RT-qPCR).

2.5. Producción del anticuerpo anti-IgT de rodaballo y validación por Western blot y espectrometría de masas

El anticuerpo anti-IgT de rodaballo fue elaborado por Genosphere Biotechnologies (Clamart, Francia), inyectando el péptido sintético TVTVHLLPGEDIEKKQ conjugado con KLH en conejo. El suero obtenido fue testado por ELISA frente al péptido (Tabla 1). El suero normal de rodaballo se obtuvo como ya se ha descrito previamente, y se purificó y concentró parcialmente mediante precipitación con sulfato de amonio según lo descrito por (Grodzki y Berenstein). En resumen, 10 ml de suero se centrifugaron a 10000 g durante 30 min a 4 °C. El precipitado se descartó y se le añadió 1 ml de Tris-HCl (pH 8,0) al sobrenadante. En agitación constante, se añadieron 5,5 ml de sulfato de amonio saturado gota a gota y se incubó 6 horas a 4 °C, tras lo cual la muestra se centrifugó de nuevo a 10000 g durante 30 min. El sobrenadante se descartó y el precipitado se lavó dos veces con PBS y se resuspendió en 1 ml de PBS. Finalmente, la muestra se dializó exhaustivamente frente a PBS durante 24 h para eliminar el sulfato de amonio.

Para la validación del anticuerpo, las muestras se diluyeron en tampón Laemmli (Bio-Rad) en condiciones reductoras. La reducción de muestras se llevó a cabo en tampón Laemmli con 0,02 M de

ditiotritol (Sigma-Aldrich), hirviéndolas en agua destilada durante 5 min. Las muestras se corrieron en un gel Mini-PROTEAN® TGX™ de 4–20% (Bio-Rad). Las proteínas se transfirieron con una célula de transferencia semiseca Trans-Blot SD (Bio-Rad), con tampón de transferencia (Tris 48 mM, glicina 29 mM, SDS al 0,037% y metanol al 10%, pH 9,2) a 15 V durante 40 minutos en una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm de tamaño de poro (Bio-Rad). La membrana se bloqueó con Tampón Tris Salino (TBS) (50 mM Tris, 0,15 M NaCl, pH 7,4) con 0,2% de Tween 20 (TBS-T₁) con leche desnatada al 5% y se incubó a 4 °C durante la noche con el anticuerpo anti-IgT diluido 1:2000 en TBS-T₁ con leche desnatada al 1%. El anticuerpo anti-IgT se preincubó con KLH (1 mg/ml) (Sigma-Aldrich). Después de 3 lavados de 15 minutos con TBS con 0,05% de Tween 20 (TBS-T₂) y dos lavados de 10 minutos con TBS, la membrana se incubó con una dilución de 1:2000 de cabra anti-conejo-HRP (Dako) en TBS-T₁ durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras 3 lavados de 15 minutos con TBS-T₂ y 2 lavados de 10 minutos con TBS, las membranas se visualizaron con 0,003% de H₂O₂ y 0,06% de tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobencidina con NiCl₂ al 0,03% (DAB/NiCl₂) (Sigma-Aldrich). Las membranas se fotografiaron con una cámara Panasonic DMC-TZ4.

Para determinar si la banda identificada por Western Blot se correspondía con la IgT se corrió una muestra de suero precipitado con sulfato de amonio y reducido en un gel Mini-PROTEAN®

TGX™ de 4–20% (Bio-Rad). Las bandas se visualizaron tiñendo el gel con BlueSafe (Nzytech) y se escindieron con un escalpelo a la altura de la banda identificada por Western Blot, tras lo cual se enviaron a la Unidad de Masas y Proteómica de la Universidad de Santiago de Compostela para su identificación por espectrometría de masas.

Dilución de anti-IgT	Conejo	
	Preimmune	Inmunizado
1:1000	0,101	1,71
1:10000	0,078	1,00
1:100000	0,041	0,54

Tabla 1: Reconocimiento del péptido sintético con anti-IgT por medio de ELISA llevado a cabo por Genosphere technologies.

2.6. Determinación del nivel de anticuerpos específicos en suero

El nivel de la IgM e IgT específicas contra *P. dicentrachi* se midió mediante ELISA doble indirecto, según lo descrito previamente (Lamas *et al.*, 2008), con modificaciones menores. En resumen, las placas de ELISA de 96 pocillos (IWAKI) se tapizaron con 10 mg/ml de antígeno entero sonicado en tampón carbonato-bicarbonato 0,05 M (pH 9,6) e se incubaron toda la noche a 4 °C. Las placas se lavaron tres veces con tampón Tris salino (TBS) (50 mM Tris, 0,15 M NaCl,

pH 7,4) con 0,05% de Tween 20 (TBS-T₂) y se bloquearon durante 1 h a 37 °C con TBS con 0,2 % de Tween (TBS-T₁) y 5% de leche en polvo desnatada, tras lo que se lavaron 5 veces con TBS-T₂. Posteriormente, se incubaron 1 h a temperatura ambiente con 100 µl de una dilución de TBS-T₁ con 1% de leche desnatada a la que se le añadió suero de rodaballo, tras lo cual se lavaron 5 veces con TBS-T₂. Para la detección de la IgM específica, se emplearon 100 µl de una dilución de anti-IgM de rodaballo hecha en ratón (UR3) (Estévez *et al.* 1994) diluida 1:400 en TBS-T₁ con 1% de leche desnatada y se incubó durante 1 h temperatura ambiente. Para la detección de las IgT específicas, se añadieron 100 µl de una dilución 1:5000 del anticuerpo policlonal anti-IgT de rodaballo hecho en conejo en TBS-T₁ con 1% de leche desnatada y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se llevaron a cabo 5 lavados con TBS-T₂. Los pocillos se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente con 100 µl de una dilución de anticuerpos en TBS-T₁, de cabra antiratón IgG marcados con peroxidasa (1:1000) (Dako) para detectar IgM o con anticuerpos de cabra anticonejo IgG marcados con peroxidasa (1:2000) (Dako) para detectar IgT. Después de 10 lavados en con TBS-T₂, se añadieron 50 ml de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Sigma-Aldrich) a cada pocillo y se dejó incubando durante 20 min a temperatura ambiente. La reacción se paró con 50 µl de H₂SO₄ 2 M y la densidad óptica se midió a 450 nm con un lector de placas modelo 680 (Bio-Rad).

2.7. Inmunofluorescencia

La recuperación antigénica se realizó calentando las muestras en tampón citrato 0,01 M (pH 6) durante 30 min en un baño a 95 °C. La autofluorescencia fue eliminada con glicina (0,1 M; pH 2,3; Sigma-Aldrich) durante 10 min a temperatura ambiente, según lo descrito por Zhang *et al.* (2010). Para reducir el fondo, las muestras se incubaron con suero normal de caballo (2,5 %; Vectorlabs) durante 30 min a temperatura ambiente. Las secciones se incubaron luego toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario hecho en ratón (anti-PCNA o anti-IgM) (Tabla 2) en diluyente de anticuerpo (Dako). Posteriormente, las secciones se lavaron durante 5 min y se añadió el segundo anticuerpo primario (anti-PCNA o anti-IgT o anti-IgD) (Tabla 2) hecho en conejo y se incubaron toda la noche a 4 °C. A continuación, las secciones se lavaron tres veces con TBS-Tween 0,05% y otras tres con TBS. El anticuerpo secundario VectaFluor™ Duet Double labeling kit (Vectorlabs) se añadió a los portaobjetos y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Las secciones se lavaron tres veces con TBS-Tween 0,05% y otras tres con TBS. Los núcleos de las células se tiñeron con DAPI (1 µg/ml en TBS; Sigma-Aldrich) durante 5 min. Las secciones se lavaron tres veces con TBS y otras tres veces con agua destilada, siendo cada uno de los lavados de 5 min. Posteriormente, se dejaron secar durante 30 min a 37 °C y se montaron con medio Mowiol® (Sigma-Aldrich). Los controles negativos se llevaron a cabo sustituyendo el anticuerpo anti-IgT por suero

preimmune de conejo (1:8000) o preincubando el anti-IgT con KLH (Sigma-Aldrich) a 1 o 10 mg/ml. Todas las incubaciones se llevaron a cabo en una cámara húmeda. La concentración de los anticuerpos empleada se recoge en la Tabla 2.

Anticuerpos	Dilución	Fuente
Ratón monoclonal anti-IgM de rodaballo (Hc)	1:400	Estévez <i>et al.</i> (1994)
Conejo policlonal anti-IgT de rodaballo (Hc)	1:8000	Elaboración propia
Conejo monoclonal anti-IgD de rodaballo (Hc)	1:500	Amablemente cedido por la Dra. Carolina Tafalla
Ratón monoclonal anti-PCNA	1:5000	Abcam (ab29)
Conejo monoclonal anti-PCNA	1:2500	Abcam (ab18197)

Tabla 2. Anticuerpos primarios empleados en inmunofluorescencia

2.8. PCR cuantitativa (con transcriptasa inversa) (RT-qPCR)

El ARN total del bazo se extrajo y el ADNc se sintetizó, con ligeras modificaciones, según lo descrito anteriormente (Fontenla *et al.*, 2016). Resumiendo, se empleó el método del TRI Reagent® (Sigma-Aldrich) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN resultante se secó, se disolvió en agua libre de ARNasas y se cuantificó en un espectrofotómetro Nano Drop ND-1000 (NanoDrop, Technologies). El ARN total se trató con ADNAasa I (Thermo Scientific) para eliminar la posible contaminación con ADN genómico. 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. 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 3). Las mezclas se incubaron durante 5 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de incubación (10 s a 95 °C y 30 s a 60 °C) y un ciclo de disociación consistente en 15 s a 95 °C, 15 s a 55 °C y 15 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). El tamaño y la especificidad de los productos de PCR se comprobaron en un gel de agarosa al 2%. La expresión normalizada de los genes se determinó por el método CT comparativo (Schmittgen y Livak, 2008) mediante software, de acuerdo a las guías de la mínima información para la publicación de experimentos de RT-qPCR (Bustin et al., 2009; Bustin y Wittwer, 2017). Se comprobaron los genes de la β-actina, factor de elongación 1-alfa y *gadh* para su uso como gen control constitutivo, identificando la β-actina como la más estable en las

condiciones del experimento y siendo esta la empleada en las RT-qPCR.

Gen	Secuencia (5'→3') Directo	Secuencia (5'→3') Reverso
<i>actb</i>	TTTGAGCAGAAATGGGAAC	GTGTTGGCGTACAGGTCCTT
<i>ee1fa</i>	GGAGGCCAGCTCAAAGATGG	ACAGTTCCAATACCGCCGATTT
<i>gapdh</i>	AGAGCTGGTTTCTGCTCAA	TGGACTCAACCACGTACTIONG
<i>gata3</i>	CAGGAGGACAAGGAGTGCAT	CGGGGACATATTGTGGGTAT
<i>ifng</i>	AGGGCAGTGTGTGTCTGTG	AGTGCAGCAGGAGGTTCTGT
<i>igd</i>	AGTAAACCTTCGGCCACCTT	CTCTTGCTTTTGTGGGGTTC
<i>il10</i>	CCTGGCTCTGTTGTCTCTCC	TAGTCTCCCTGAGCCTCCT
<i>il6</i>	GTAGCCAGGAGGAGCAACTG	TCTTTTGCGGATCGCTAGTT
<i>migm</i>	AGGGTGCTGTATGAAAGGACTACTGAAATC	AGAGTGATGAGGAAGAGAAGGATGAAGGT
<i>migt</i>	CTGAGCTGCACAGAAGATGCCATTGAA	AGAAATATGAAGGAGGAGGTTGTGGACCA
<i>qmhcii</i>	TCGCTTGTGCCTCAGTGTC	TGTTGACGAGGTCAGCAAAC
<i>sigm</i>	TTTCGTGTCTTGCCCTTGTTG	TACCCAGTGGATCGGACAAT
<i>sigt</i>	GCCTGCTGGCAGCAATAATTCC	CTATTTACATTCAAGGGCGTAACCCATACC
<i>tbx21</i>	CTCCAGTCGCTGCACAAGTA	GGGAAGACGAAGGTCTGAGC
<i>tcr</i>	CATTGAACCGAAGGACGATT	GTTGTGGTCCGGTCTGATCT
<i>tnfa</i>	CACTCCAGCTTGTCTGTGA	GAAAACAGATCCCCACTCCA

Tabla 3. Secuencias específicas de cebadores para la qPCR. *actb*: β actina; *ee11fa*: factor de elongación 2 α; *gapdh*: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; *gata3*: proteína 3 de unión a la secuencia de ADN GATA; *ifng*: interferón γ; *igd*: inmunoglobulina d (cadena pesada); *il10*: interleucina 10; *il6*:

interleucina 6; *migm*: inmunoglobulina M (forma de membrana); *migt*: inmunoglobulina T (forma de membrana); *mhcii* (molécula de histocompatibilidad de tipo 2 (cadena α); *sigm*: inmunoglobulina M (forma secretada); *sigt*: inmunoglobulina T (forma secretada); *tbx21*: factor de transcripción caja T 21; *tcr*: receptor de células T (cadena α); *tnfa* (factor de necrosis tumoral α).

2.9. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo empleando un análisis de la varianza (ANOVA) y un test post-hoc de Tukey. Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar. Se han considerado las diferencias significativas a $p < 0,05$; $p < 0,01$ o $p < 0,001$.

3. Resultados

3.1. Validación de los anticuerpos anti-IgT generados a partir de péptidos

La IgT es una inmunoglobulina relacionada con las mucosas de aproximadamente 180 kDa presente en peces óseos que aparece como un monómero en suero a bajas concentraciones (3,7 $\mu\text{g/ml}$) (Zhang *et al.*, 2010). En el caso del rodaballo, realizamos una precipitación de las proteínas del suero utilizando sulfato de amonio, un método de precipitación muy empleado en varios organismos, incluidos mamíferos y pollo (Habeb y Francis, 1976; Ko y Ahn, 2007; Mariam *et al.*, 2015). En la muestra concentrada, la IgT de rodaballo reducida aparece como una banda de ~ 70 kDa en el Western blot (Fig. 1) cuya identidad fue confirmada por espectrometría de

masas tras el análisis de los péptidos en un nanocromatógrafo acoplado a un espectrómetro de masas tipo trampa de iones (nLC-Trampa de iones) (Fig. 2).

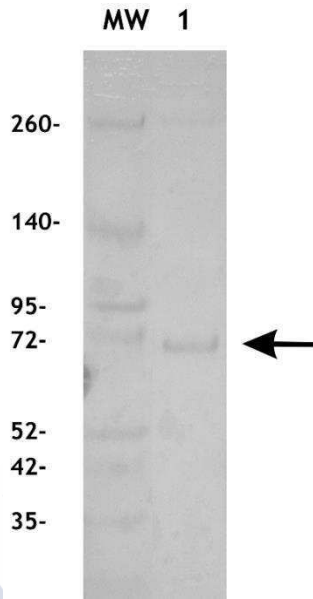


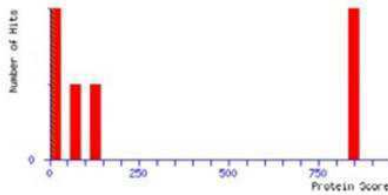
Fig. 1. Western blot realizado a partir de suero de rodaballo reducido usando como anticuerpo primario anti-IgT. Carril Mw; marcador de peso molecular en kDa. Carril 1: suero. La flecha negra indica la banda que se correspondería con la cadena pesada de la IgT.

Mascot Search Results

User : ██████████
Email : ██████████
Search title :
MS data file : DATA.TXT
Database : Scophthalmus_aa aa (737 sequences; 169406 residues)
Timestamp : 29 Mar 2019 at 11:54:06 GMT
Protein hits : [ACE84011.1](#) immunoglobulin heavy chain secretory form [Scophthalmus maximus]
[AMN62819.1](#) immunoglobulin membrane form [Scophthalmus maximus]
[AMQ49169.1](#) immunoglobulin tau heavy chain membrane-bound form [Scophthalmus maximus]
[AMQ49170.1](#) immunoglobulin tau heavy chain secretory form [Scophthalmus maximus]
[CAC41011.1](#) Pit-1 protein, partial [Scophthalmus maximus]
[ANA88532.1](#) leptin receptor [Scophthalmus maximus]

Mascot Score Histogram

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 13 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Peptide Summary Report

Format As: Peptide Summary [Help](#)
 Significance threshold $p < 0.05$ Max. number of hits AUTO
 Standard scoring MudPIT scoring Ions score or expect cut-off 13 Show sub-sets 0
 Show pop-ups Suppress pop-ups Sort unassigned Decreasing Score Require bold red
 Error tolerant

3. [AMQ49169.1](#) Mass: 67914 Score: 132 Matches: 8(8) Sequences: 2(2) emPAI: 0.17
 immunoglobulin tau heavy chain membrane-bound form [Scophthalmus maximus]
 Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 189	548.2110	1094.4074	1094.5794	-0.1719	0	(55)	8.1e-006	1	U	K.VYLQMSLK.T
<input checked="" type="checkbox"/> 150	548.2120	1094.4094	1094.5794	-0.1699	0	(52)	9.8e-006	1	U	K.VYLQMSLK.T
<input checked="" type="checkbox"/> 156	556.2340	1110.4534	1110.5743	-0.1209	0	(54)	4.5e-006	1	U	K.VYLQMSLK.T + Oxidation (M)
<input checked="" type="checkbox"/> 157	556.2440	1110.4734	1110.5743	-0.1009	0	55	3.6e-006	1	U	K.VYLQMSLK.T + Oxidation (M)
<input checked="" type="checkbox"/> 251	674.7070	1347.3994	1347.5765	-0.1771	0	(53)	5.1e-006	1	U	K.TEDTAVYYCAR.D
<input checked="" type="checkbox"/> 252	674.7100	1347.4054	1347.5765	-0.1711	0	77	3.6e-008	1	U	K.TEDTAVYYCAR.D
<input checked="" type="checkbox"/> 253	674.7200	1347.4254	1347.5765	-0.1511	0	(65)	3.5e-007	1	U	K.TEDTAVYYCAR.D
<input checked="" type="checkbox"/> 254	674.7220	1347.4294	1347.5765	-0.1471	0	(46)	2.7e-005	1	U	K.TEDTAVYYCAR.D

4. [AMQ49170.1](#) Mass: 62820 Score: 77 Matches: 2(2) Sequences: 1(1) emPAI: 0.06
 immunoglobulin tau heavy chain secretory form [Scophthalmus maximus]
 Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 246	667.7300	1333.4454	1333.5609	-0.1154	0	77	2.1e-008	1	U	K.TEDSAVYYCAR.E
<input checked="" type="checkbox"/> 247	667.7340	1333.4534	1333.5609	-0.1074	0	(73)	5.2e-008	1	U	K.TEDSAVYYCAR.E

Fig. 2. Informe proporcionado por la Unidad de Espectrometría de Masas y Proteómica de la Universidad de Santiago de Compostela identificando la cadena pesada de la inmunoglobulina T en sus formas de membrana y secretada.

3.2. Puesta a punto de los anticuerpos anti-IgM y anti-IgT en inmunofluorescencia

Previamente a su uso en el análisis de las poblaciones de linfocitos en el bazo mediante inmunofluorescencia, y dado que el anticuerpo anti-IgT no se había testado antes, se hicieron varias pruebas de marcaje en la sangre, bazo y las mucosas de rodaballos control. Estos marcajes se hicieron conjuntamente con los del anticuerpo anti-IgM (UR3) que, aunque había sido empleado en ELISA y Western blot, hasta el momento no se había usado en inmunofluorescencia (Estévez et al., 1994). Las células IgM⁺ son abundantes en la sangre, mientras que las células IgT⁺ son mucho más escasas. En cualquier caso, la morfología de ambas es compatible con la de linfocitos (Fig. 3). No se ha observado marcaje cuando el anticuerpo anti-IgT fue sustituido por suero preinmune de conejo en ninguno de los tejidos analizados.

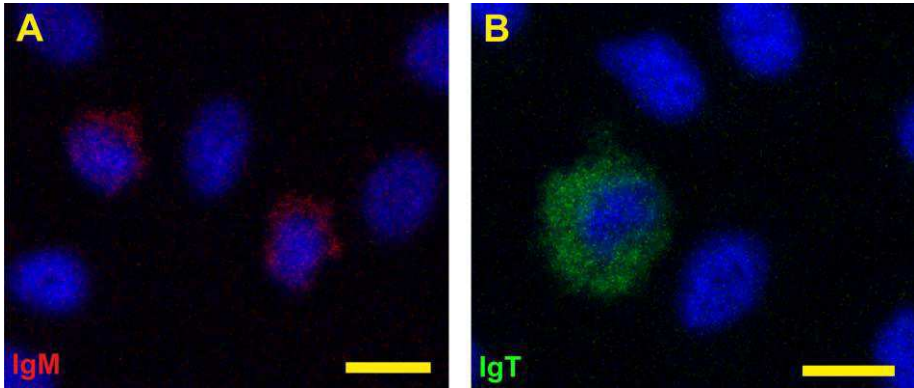


Fig. 3 Fotomicrografías de frotis de sangre de peces no inmunizados. Se observan células B IgM⁺ (A) y células IgT⁺ (B). Escala: 5 μ m.

3.3. Nivel de anticuerpos específicos en suero

Para establecer si la vacuna ha generado producción de inmunoglobulinas contra *P. dicentrarchi*, realizamos un ELISA para determinar los niveles de IgM e IgT específicas en suero a los días 37 y 60 de la primera inmunización. Tal y como se esperaba, los peces inyectados con la vacuna (antígeno + adyuvante) presentaron un aumento del nivel de anticuerpos IgM específicos frente a *P. dicentrarchi* a los 37 y 60 días después de la vacunación, en relación al PBS. El grupo antígeno mostró diferencias significativas con el PBS a los 37 días, pero no a los 60 (Fig. 4).

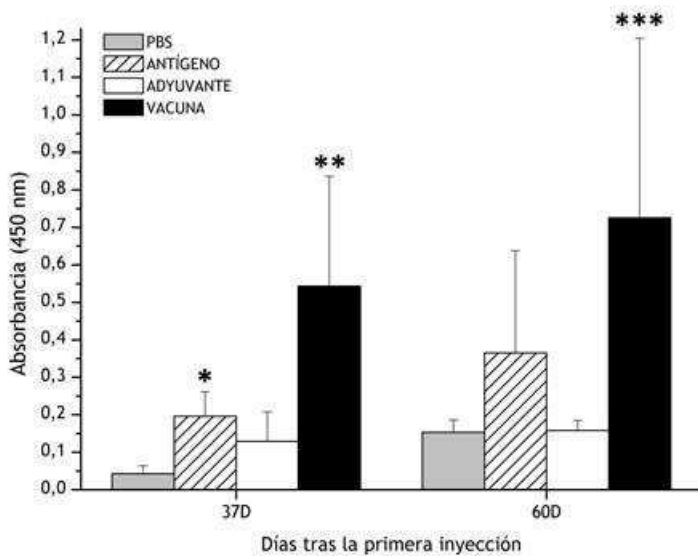


Fig 4. Niveles de IgM específica en el suero de peces inmunizados, medidos por ELISA, a los 37 y 60 días después de la inyección con PBS, antígeno, adyuvante (Montanide) o vacuna (antígeno + adyuvante). Los peces se inmunizaron a los días 0 y 30. Los valores medios \pm desviación estándar se muestran para cada grupo. Los asteriscos (*), (**) y (***) indican diferencias significativas a $p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$, respectivamente, en comparación con el grupo PBS.

La IgT específica no se generó o no fue detectable en suero mediante la técnica ELISA, no hallándose diferencias significativas con respecto al grupo PBS en ninguno de los grupos, incluido el grupo vacuna (adyuvante + antígeno) (datos no mostrados).

3.4. Estructura de un centro melanomacrofágico y cambios durante la vacunación

Los centros melanomacrofágicos (MMC) se han teñido con la técnica del ácido periódico-Schiff y contrastado con hematoxilina de Mayer (Figs. 5 y 6). Los MMCs de rodaballo son estructuras discretas que se encuentran en zonas adyacentes a elipsoides y vasos sanguíneos de mayor diámetro. Las células PAS⁺, identificadas como melanomacrófagos a pesar de su bajo contenido en melanina, presentan un gran citoplasma con numerosos gránulos PAS⁺ y un núcleo generalmente fusiforme. Estas células son escasas, aunque su citoplasma es grande y ocupa una gran superficie del MMC. Además, hemos observado un área de células linfoides con un núcleo intensamente marcado con hematoxilina que rodea a los centros melanomacrofágicos. Al conjunto de células linfoides que lo rodean lo hemos denominado zona linfoide asociada al centro melanomacrofágico. Hemos encontrado, asimismo, células conteniendo material PAS⁺, en forma de vacuolas de distinto tamaño, las cuales podrían corresponderse melanomacrófagos en formación o en migración. Habitualmente, los MMCs se encuentran asociados a elipsoides desde los que las células migran hacia la zona de influencia del MMCs o viceversa. En el caso de los peces vacunados o supervivientes a la infección, tanto la zona de los melanomacrófagos como la de células linfoides estaban bien desarrolladas.

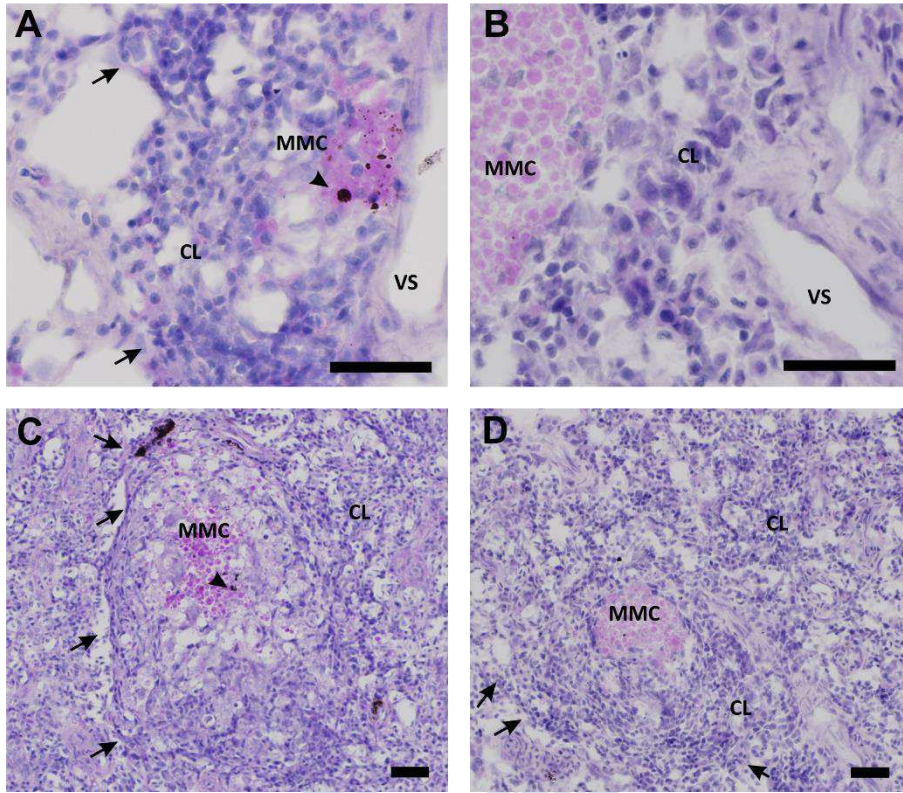


Fig. 5. Secciones de bazo mostrando la estructura de los centros melanomacrofágicos y el tejido linfoide asociado. Los centros melanomacrofágicos (MMC) de los peces no inmunizados son pequeños y compactos (A), mientras que los de peces inyectados son grandes y con distintos grados de compactación (C y D). Los MMCs siempre muestran tejido linfoide asociado (CL), que ocupa una mayor área en los peces vacunados (C) o vacunados e infectados (D). B: Detalle de un MMC cercano a un vaso sanguíneo (VS). Las flechas delimitan el CL. Las puntas de flecha señalan melanomacrófagos con gránulos de melanina. Escala: 50 μ m

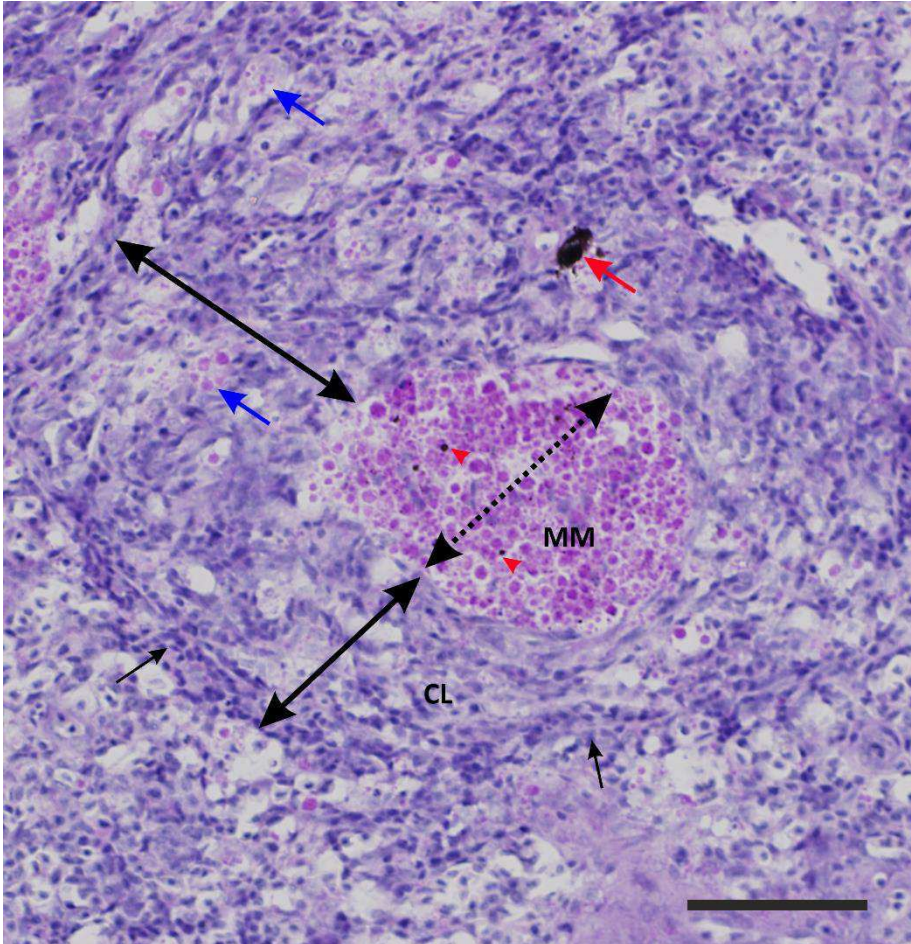


Fig. 6. Fotomicrografía de un centro melanomacrofágico típico de un pez vacunado teñido con la técnica ácido periódico de Schiff (PAS) y contrastado con hematoxilina de Mayer. La flecha doble discontinua muestra el centro melanomacrofágico, ocupado por varios melanomacrófagos (MM) con material PAS⁺ en su interior. Las flechas dobles continuas delimitan una banda de células linfoides (CL) que rodea a los MMs. Las flechas negras señalan la zona limitante de lo que sería la zona linfoide. Esta zona es rica en células con material PAS⁺ positivo (flecha azul). También se observa un melanomacrófago lleno de granos (flecha roja).

de melanina (flecha roja) Las puntas de flecha rojas señalan melanomacrófagos con escasos granos de melanina. Escala: 25 μ m.

A los 60 días hemos observado un aumento de la organización de los centros, apareciendo más compactos y menos dispersos que a tiempos anteriores. Además, del número de MMCs aumentó en los grupos antígeno, adyuvante y vacuna con respecto al grupo PBS. Sin embargo, no hemos observado diferencias significativas entre los grupos antígeno, adyuvante y vacuna (Fig. 7). De forma similar, los peces inyectados con antígeno, adyuvante o vacuna mostraron un aumento significativo del área correspondiente a los melanomacrófagos (Fig. 8). Aunque se han observado distintos grados de compactación en los cuatro grupos (PBS, antígeno, adyuvante y vacuna), no hemos encontrado diferencias entre ellos (Fig. 9).

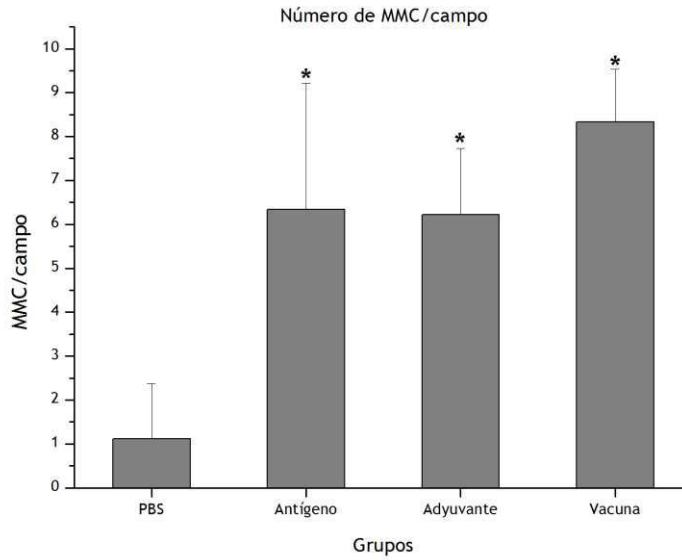


Fig. 7. Número de centros melanomacrofágicos PAS⁺ observados en los bazos de rodaballo a los 60 días de la vacunación. Se han efectuado un recuento de 3 campos por cada sección de bazo a 20X de aumento (n=10). Los datos se muestran como media ± desviación estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas con respecto al PBS con $p < 0,05$.

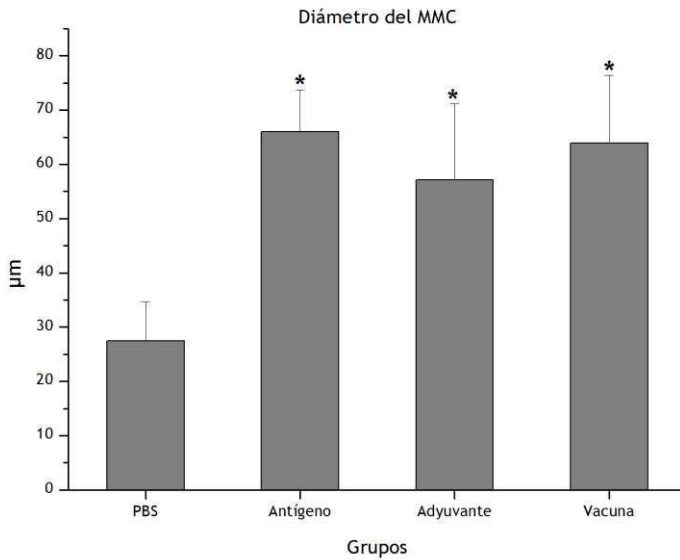


Fig. 8. Diámetro de los centros melanomacrofágicos (zona de los melanomacrófagos) PAS⁺ observados en los bazo de rodaballo a los 60 días de la vacunación. Se han efectuado una medida de los MMCs presentes en 3 campos por cada sección de bazo a 20X de aumento (n=10). Los datos se muestran como media ± desviación estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas con respecto al PBS con $p < 0,05$.

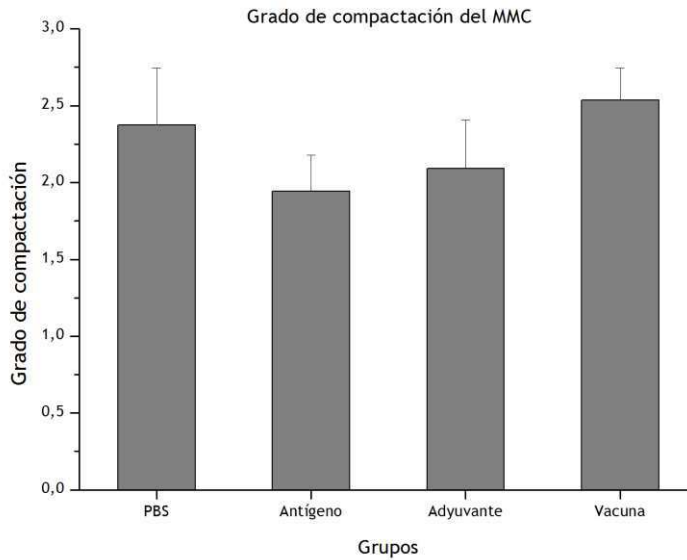


Fig. 9. Grado de compactación de centros melanomacrófagos (zona de los melanomacrófagos) PAS⁺ observados en los bazo de rodaballo a los 60 días de la vacunación. La compactación se ha clasificado del 1 al 3, siendo 1 no compacto y 3 muy compacto. Se han efectuado una clasificación de los MMCs presentes en 3 campos por cada sección de bazo a 20X de aumento (n=10). Los datos se muestran como media ± desviación estándar ($p < 0,05$).

3.5. Distribución de células B IgM⁺, IgT⁺ e IgD⁺ en el bazo de peces control y estudio de la proliferación celular

Se han analizado las poblaciones de células B IgM⁺, IgD⁺ e IgT⁺ y la actividad proliferativa mediante el uso de un anticuerpo anti-PCNA en el bazo de peces control (peces que no sufrieron ningún tipo de manipulación). La presencia del antígeno nuclear de células en

proliferación (PCNA) en las células se ha asociado con la proliferación de las mismas en peces (Abós *et al.*, 2018).

En el bazo de rodaballo control, la pulpa blanca está poco desarrollada, aunque fue posible identificar varias capas de células linfoides en la pared de los vasos sanguíneos, especialmente en el centro del bazo, donde se encuentran los vasos más grandes, y también alrededor de los centros melanomacrófagos (MMCs). Los MMCs, que son muy escasos y de pequeño tamaño, están rodeados por una zona asociada rica en células linfoides, que ocupan una región que puede delimitarse claramente con respecto al resto del tejido por dos capas de células. Se encontraron células IgM⁺ en grupos a lo largo de las áreas periarteriolas y en las paredes de los elipsoides (Fig. 10A). También se observaron dispersas a lo largo de todo el parénquima del bazo (Fig. 11A). Además, se encontraron al lado de las delgadas paredes del sistema venoso, especialmente en aquellas ubicadas en el centro del órgano. La concentración más alta de células B IgM⁺ se encontró en las áreas linfoides adyacentes a los MMCs, donde pueden aparecer en contacto con la zona de los melanomacrófagos, aunque se ubicaron normalmente separadas de ellos (Fig. 12A). Esas áreas linfoides asociadas a los MMCs son ricas en células PCNA⁺, lo que indica una alta tasa de división celular en esa zona (Fig. 12A). Sin embargo, ocasionalmente, las células IgM⁺ en proliferación se encontraron asociadas a los vasos (Fig. 11C).

Las células B IgT^+ aparecieron generalmente en grupos ubicados cerca de la pared de los vasos sanguíneos, donde se pueden encontrar adyacentes a la pared de las arteriolas y los capilares o vénulas (Fig. 10C). Se pueden mezclar con células IgM^+ o ubicarse por separado. En comparación con las células IgM^+ , las células IgT^+ aparecieron menos dispersas, ocupando áreas más discretas. También se observaron células B IgT^+ alrededor de los MMCs, en muchos casos mezcladas con células IgM^+ ; sin embargo, en otros casos aparecieron formando un grupo por separado. Además, se observaron células B IgT^+ dispersas a lo largo de todo el parénquima del bazo, pero fueron más escasas que las células IgM^+ (Fig. 11B). De manera similar a lo que se ha encontrado para las células IgM^+ , una pequeña proporción de células IgT^+ también eran $PCNA^+$, encontrándose principalmente asociadas a los MMCs (Fig. 12B) y, en mucha menor medida, a los vasos sanguíneos (Fig. 11D).

Las células B IgD^+ eran muy escasas y se encontraron en cualquiera de los lugares donde se han descrito células IgM^+ . Algunas células IgD^+ también eran IgM^+ (IgM^+/IgD^+), pero ocasionalmente también hemos encontrado células IgM^-/IgD^+ . Sin embargo, la gran mayoría de las células fueron IgM^+/IgD^- (Fig. 13).

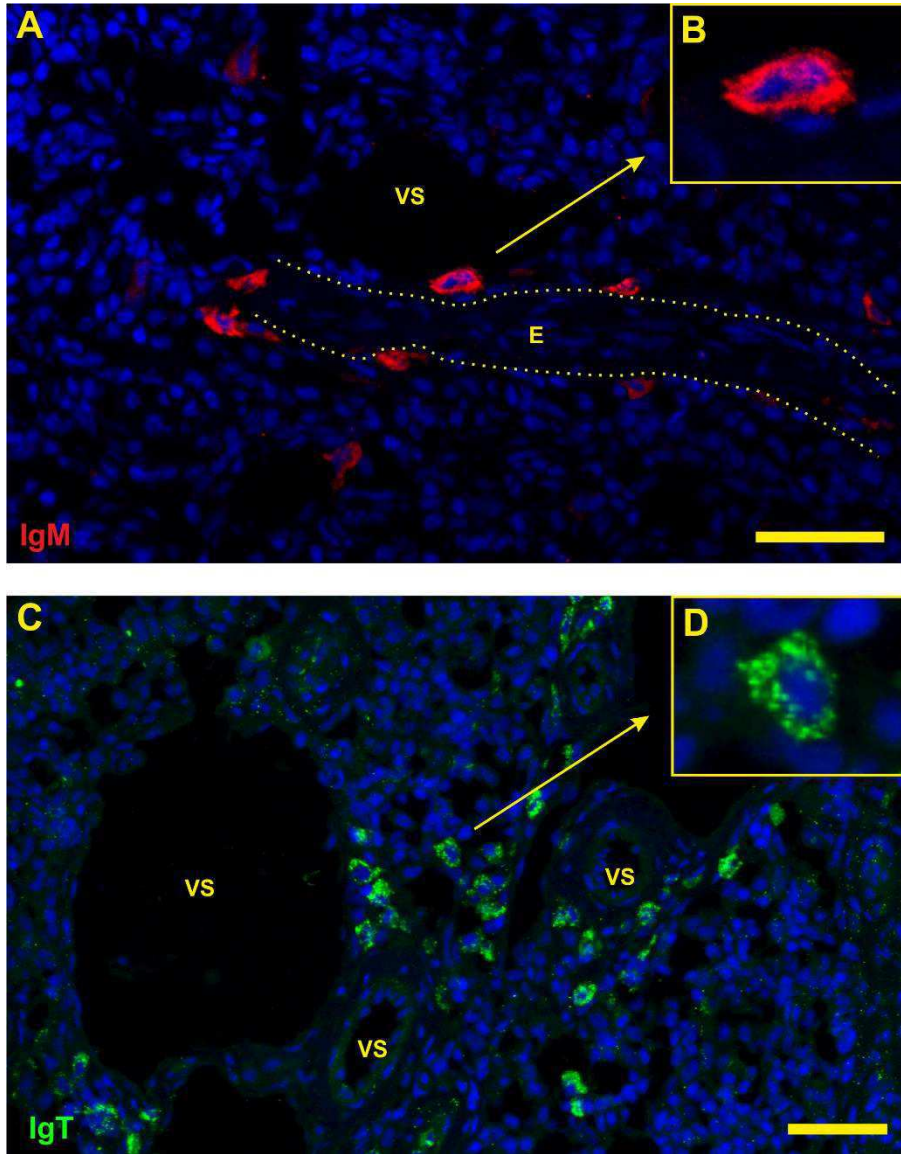


Fig 10. Fotomicrografías de secciones de bazo de rodaballo control mostrando la distribución basal de células IgM^+ (A-B) y células IgT^+ (C-D) y su relación con los vasos sanguíneos (VS). Las células IgM^+ (A) e IgT^+ (C) se disponen alrededor de los vasos sanguíneos (VS). Las dos líneas discontinuas delimitan un elipsoide (E)

con abundantes células IgM⁺ en migración. Detalle de células IgM⁺ (B) e IgT⁺ (D).

Escala: 25 μm.

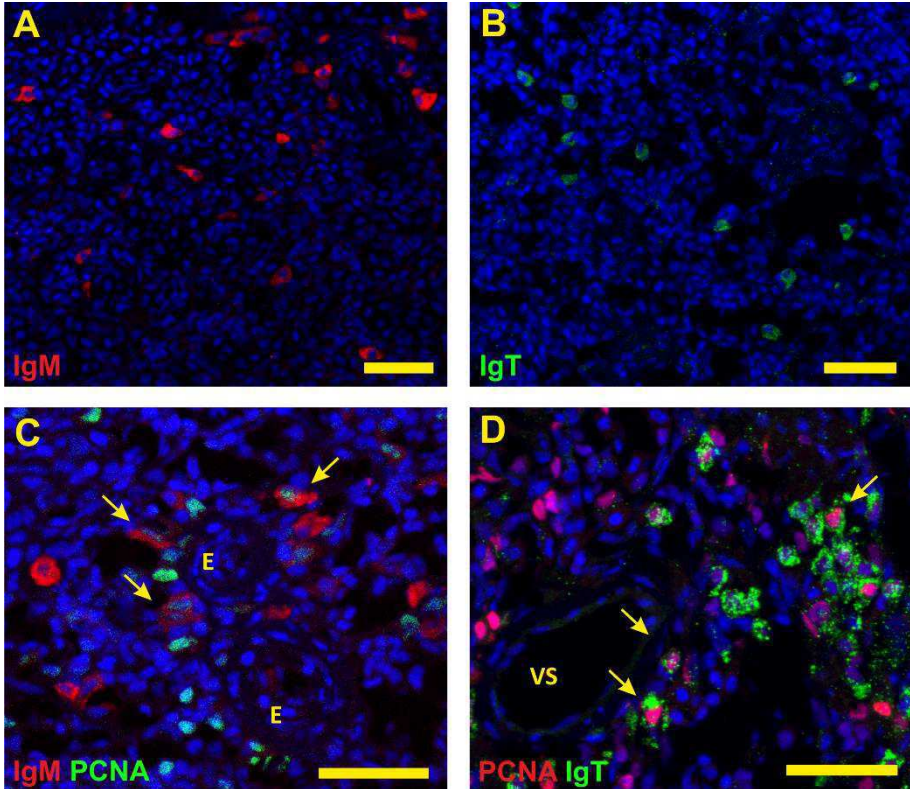


Fig 11. Fotomicrografías de secciones de bazo de rodaballo mostrando la distribución basal de células IgM⁺ (A-B) y células IgT⁺ (C-D). Las células IgM⁺ (A) e IgT⁺ (B) aparecen dispersas por todo el parénquima del bazo. Ocasionalmente, pueden observarse células IgM⁺ (C) e IgT⁺ (D) proliferando alrededor de un vaso. Las flechas indican proliferación celular Escala: 25 μm.

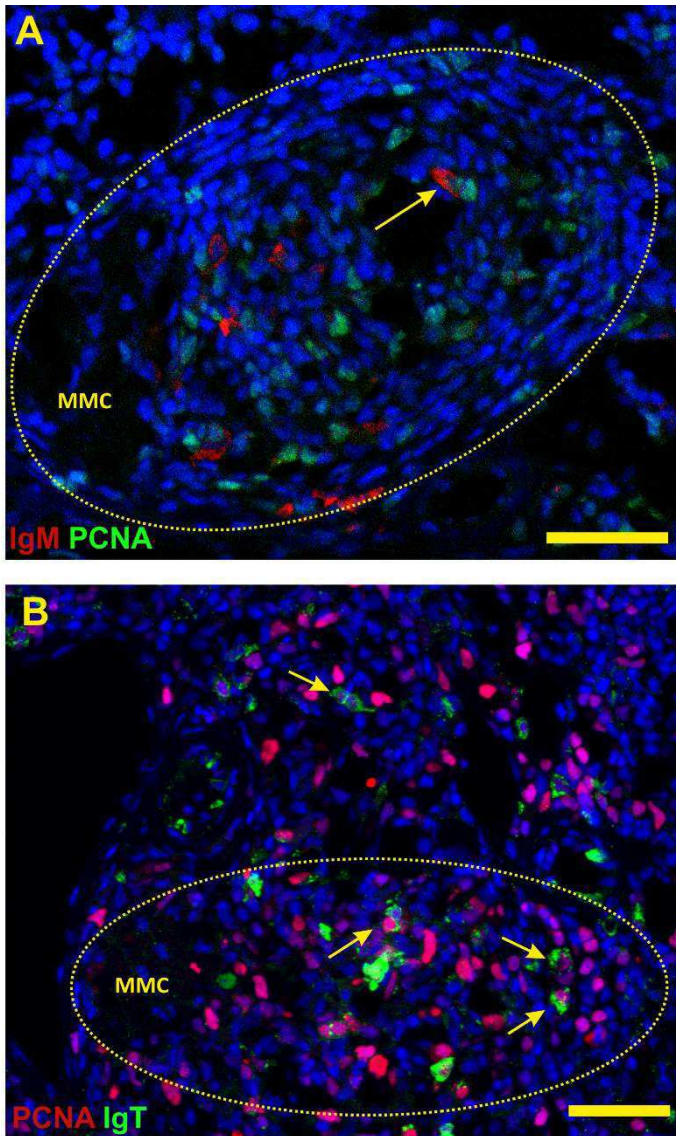


Fig 12. Fotomicrografías de secciones de bazo de rodaballo control mostrando la distribución de células IgM^+ (A) e IgT^+ (B) alrededor de los centros melanomacrófagos (MMCs). Los centros melanomacrófagos presentan una zona pequeña con melanomacrófagos a los que rodea una zona de células

linfoides, con células IgM^+ (A) e IgT^+ (B), pudiendo verse ocasionalmente en estado proliferativo (flechas). La elipse discontinua delimita la zona de los melanomacrófagos (MM) y la zona de linfocitos. Escala: 25 μm .

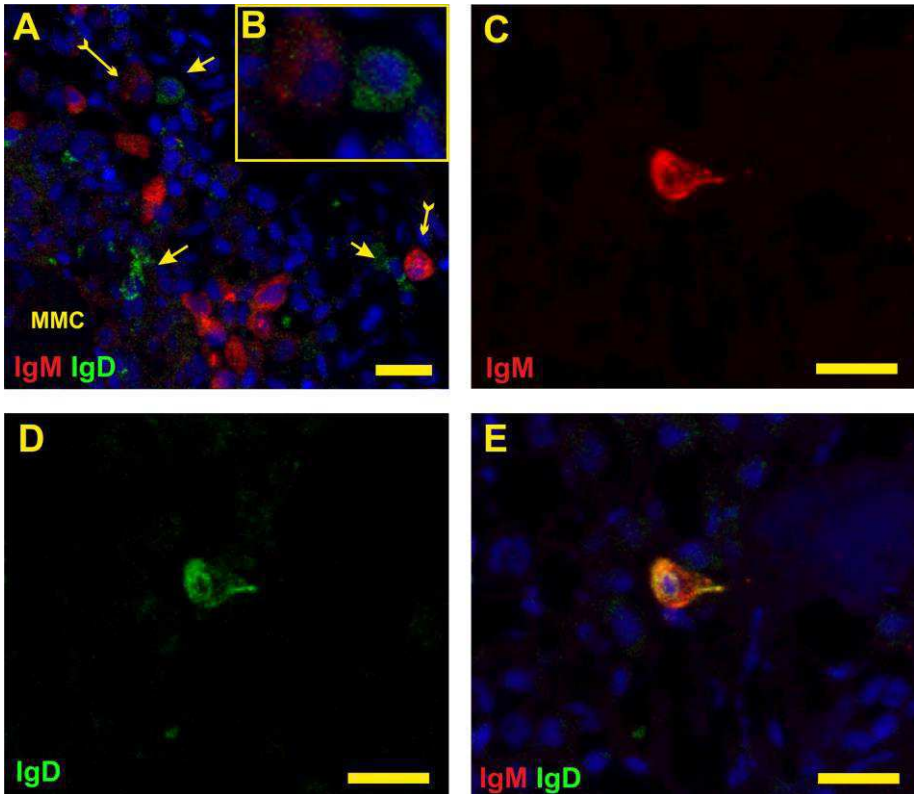


Fig. 13. Fotomicrografías de secciones de bazo de rodaballo mostrando la distribución basal de células IgD^+ . Se han identificado células IgM^+/IgD^- (flecha con remate), IgM^-/IgD^+ (flecha) e IgM^+/IgD^+ (E, F y G). (MMC): centro melanomacrófágico. Escala: 10 μm .

3.6. Distribución y proliferación de células B IgM⁺ e IgT⁺ en el bazo durante la vacunación

La inyección intraperitoneal con adyuvante o vacuna generó la formación de cúmulos o masas de células y vacuna (CMV) que aparecen adheridos a los órganos internos, incluido el bazo. Hemos analizado las poblaciones de células B IgM⁺ e IgT⁺ en el bazo de peces inyectados con PBS, antígeno, adyuvante o vacuna. A los días 3 y 7 después de la administración de la primera dosis, los peces inyectados con adyuvante o con vacuna mostraron células B IgM⁺ e IgT⁺ en las áreas de contacto entre los CMV y el bazo. Los principales cambios en el bazo a nivel histológico y celular se observaron a los días 37 y 60 (7 y 30 días después de la segunda dosis de la vacuna). Esos cambios también afectaron a los peces inyectados con PBS, en comparación con los peces de control. Ya en el día 37, seis de cada diez peces inyectados con PBS mostraron un claro aumento en el tamaño y la complejidad de los MMCs rodeados y el área linfoide adyacente. Sin embargo, estudiamos principalmente los cambios en los peces a día 60, pues a tiempos menores el bazo presentaba una gran desorganización y no fue posible observar patrones en los cambios provocados por los tratamientos.

A los 60 días, los peces inyectados con antígeno, adyuvante o vacuna mostraron un aumento en el tamaño de los grupos de MMs en relación al PBS (Fig. 14), siendo algunos de ellos compactos (Fig 14B) y otros, claramente desorganizados (Fig.14A). También

mostraron los tres grupos un aumento en el número de centros melanomacrofágicos en relación al PBS, así como del tamaño del área linfoide asociada a los mismos. La mayoría de los peces inyectados con el antígeno mostraron centros melanomacrofágicos compactos, aunque algunos de ellos todavía mostraban macrófagos dispersos. El área linfoide alrededor de los MMCs fue mayor que en los peces inyectados con PBS. Los peces inyectados con adyuvante, pero especialmente los peces inyectados con vacuna, mostraron grandes MMCs con macrófagos compactados, y el área del tejido linfoide también aumentó claramente de tamaño (Fig. 14). En los inyectados con vacuna el número de MMCs en el bazo fue claramente superior a los inyectados con PBS (Fig. 16A-B).

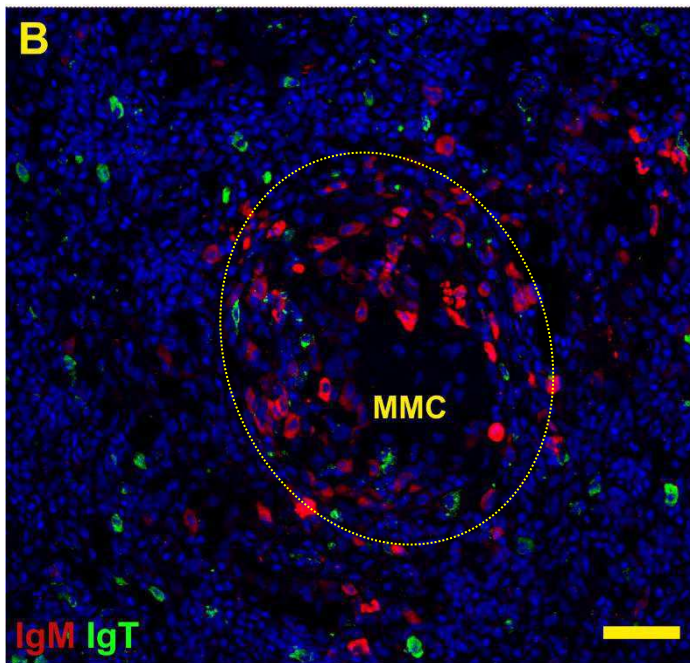
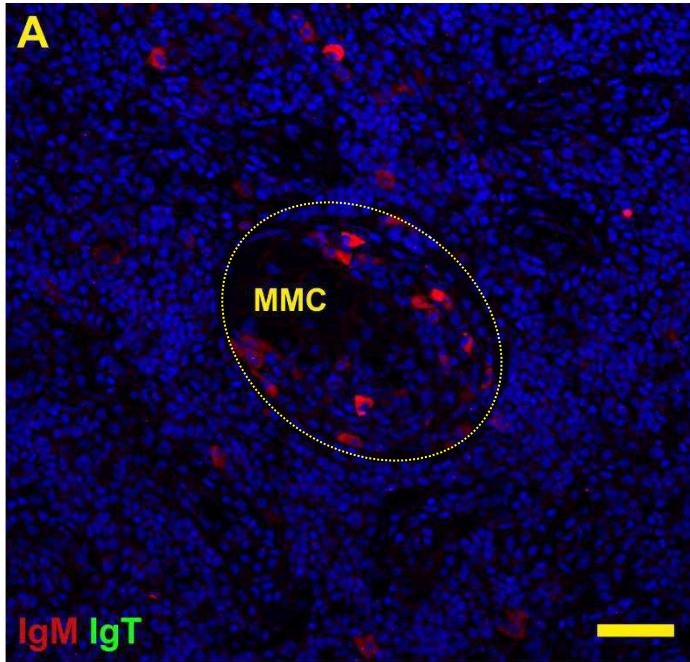
En los grupos antígeno, adyuvante y vacuna hemos identificado tres tipos de MMCs que hemos definido en función del grado de compactación de los melanomacrófagos y del tejido linfoide asociado. En función de los tipos celulares presentes en la zona de tejido linfoide asociado al MMC, algunos centros aparecen preferentemente rodeados de células IgM^+ (Fig. 14A-B), otros muestran una población mixta de células IgM^+ e IgT^+ (Fig. 15A) y otros MMCs muestran a su alrededor numerosas células IgT^+ , siendo este tipo de MMCs especialmente compacto (Fig. 15B). Hemos observado centros poco compactos y centros muy compactos. Los MMCs más compactos habitualmente están rodeados de células IgT^+ ,

aunque pueden aparecer también células IgM^+ . Los centros rodeados de células IgT^+ son muy escasos en los bazo de los peces PBS.

Curiosamente, hemos observado que las células $PCNA^+$ no se distribuyen al azar a lo largo del parénquima del bazo, sino que se encuentran principalmente formando agrupaciones en la zona de tejido linfoide que envuelve a los MMCs (Fig. 16C). Los peces inyectados con PBS mostraron un menor número de MMCS y, en directa correlación, un menor número de células $PCNA^+$ que los peces inyectados con vacuna (Figs. 16A-B). No hemos detectado ningún MMC que no tenga células en división asociadas, independientemente del grupo al que pertenezca el bazo. Muchas de estas células resultaron ser células B $IgM^+/PCNA^+$ o $IgT^+/PCNA^+$ (Fig. 17).

Página siguiente:

Fig 14. Fotomicrografías de secciones de bazo de peces de inyectados (60 días) con PBS (A) y vacuna (B) mostrando la distribución de células IgM^+ alrededor de los centros melanomacrofágicos (MMCs). Los peces inyectados con PBS (A) muestran un menor número de células B IgM^+ que en el caso del grupo vacuna (B). Escala: 25 μm .



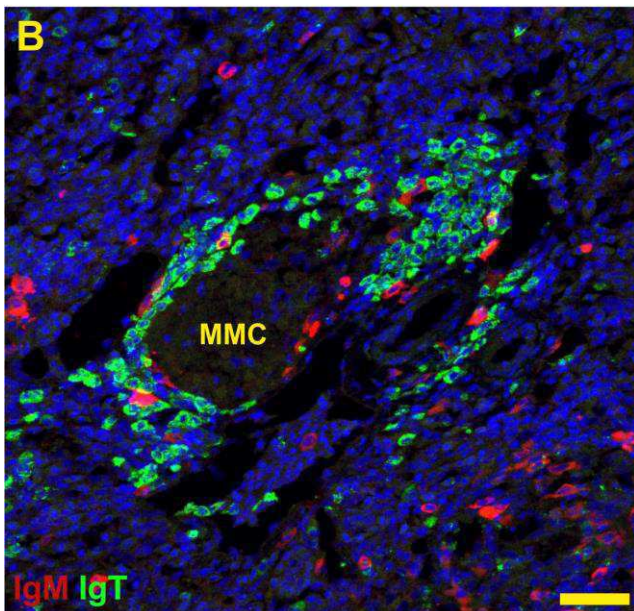
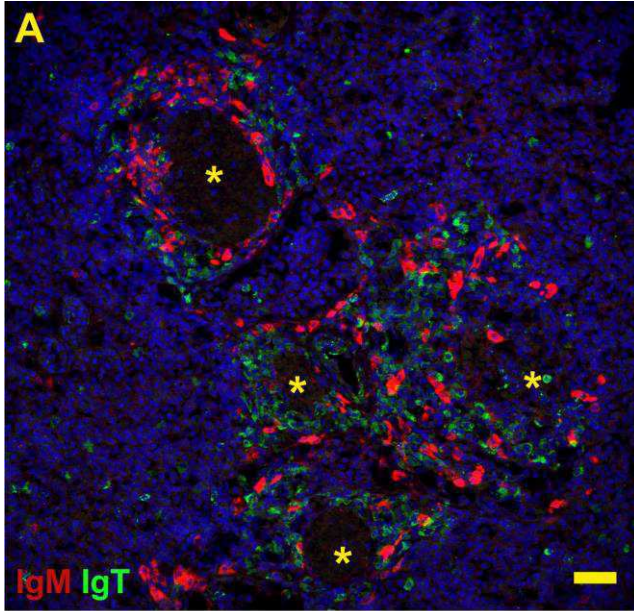


Fig 15. Fotomicrografías de secciones de bazo de peces de inyectados (60 días) con vacuna mostrando la distribución de células B alrededor de centros melanomacrofágicos (MMC; *). E algunos centros se encuentran poblaciones de células IgM⁺ e IgT⁺ (A) mientras que, en otros, de aspecto más compacto, predominan las células IgT⁺ (B). Escala: 25 µm.



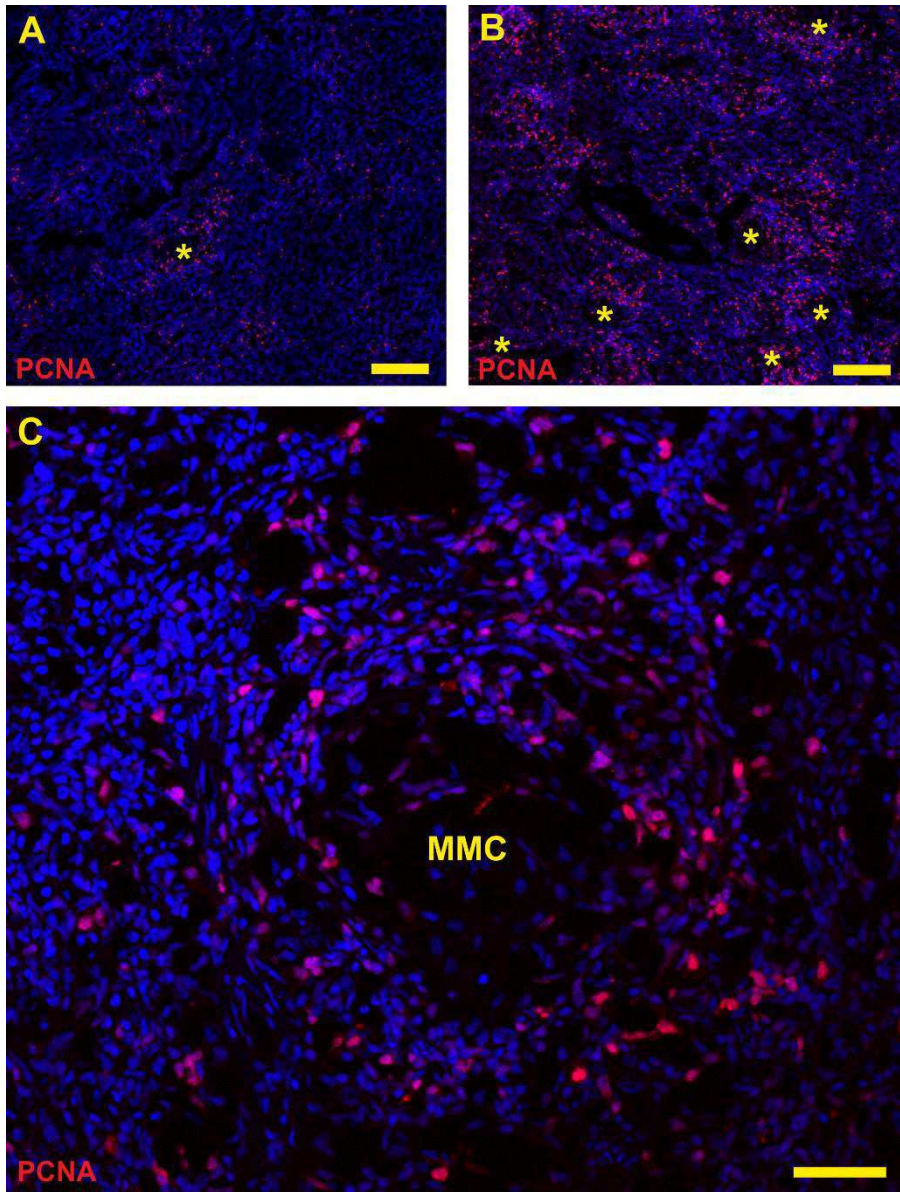


Fig 16. Fotomicrografías de secciones de bazo de peces control (A) y vacunados (B-C). A: En el bazo de peces control los centros melanomacrofágicos (MMC; *) son muy escasos y las células tienden a proliferar alrededor de ellos. B: Los

peces vacunados muestran numerosos centros melanomacrofágicos (*) rodeados por un elevado número de células PCNA⁺. C: Detalle de un centro melanomacrofágico (MMC) y células adyacentes. Se observan numerosas células en proliferación en la vaina de linfocitos que rodea al CMM. Escala: A y B: 100 μm ; C: 25 μm .



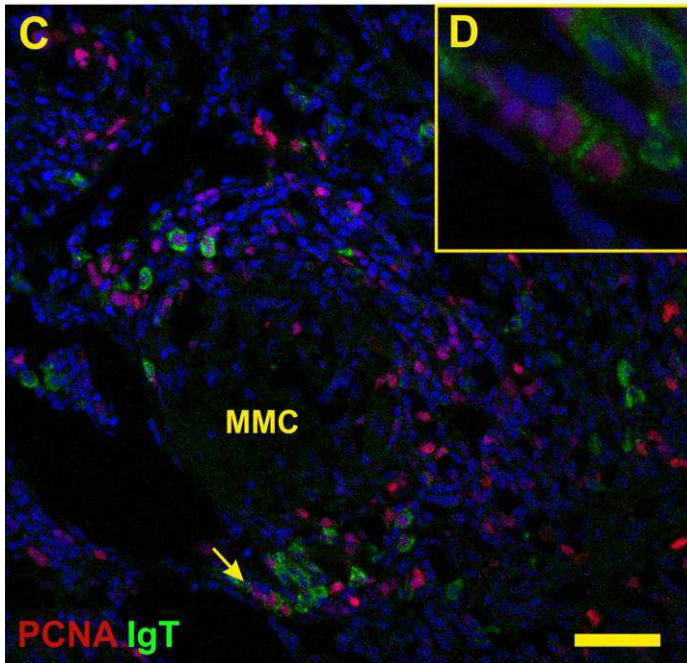
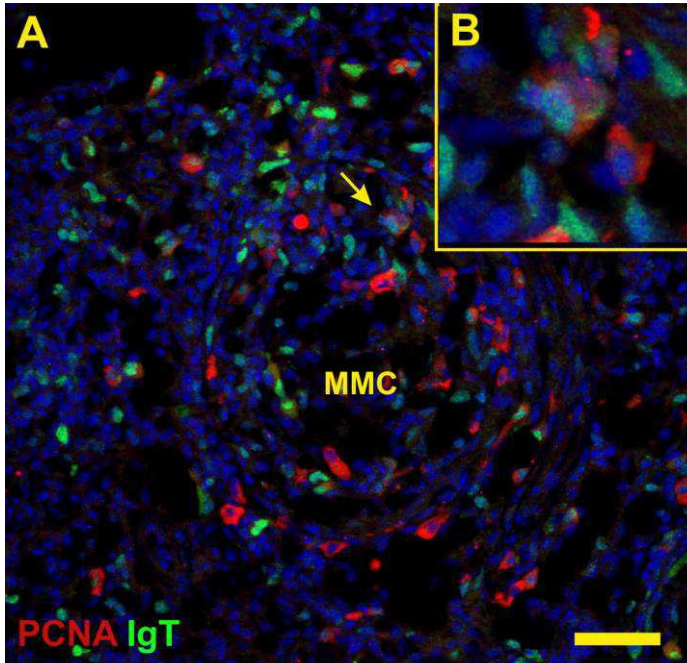


Fig 17. Fotomicrografías de secciones de bazo de peces de inyectados (60 días) con vacuna mostrando la proliferación de células B IgM⁺ (A) e IgT⁺ alrededor de los centros melanomacrofágicos (MMC). En los recuadros se muestran en detalle células IgM⁺ (A) e IgT⁺ (B) en división. Las fechas indican proliferación celular. Escala: 25 µm.

3.7. Presencia de linfocitos IgM⁺ e IgT⁺ en masas de células y vacuna adyacentes al bazo de peces vacunados

La inyección de adyuvante o vacuna generó la formación de grandes masas de células y vacuna y (CVM) en la cavidad peritoneal y esas CVM se unieron a los órganos internos, incluido el bazo, tal y como se ha descrito previamente (Noia *et al.*, 2014). Desde el tercer día, hemos encontrado CVM unidas al bazo, y la presencia de numerosos linfocitos en el área de contacto entre la CVM y el mesotelio. A los 60 días hemos detectado mediante inmunofluorescencia que algunas de las células presentes en la CVM eran células B IgM⁺ e IgT⁺ dispersas (Fig. 18A-C). No hemos detectado agrupaciones de células B como las descritas en el bazo. Además, hemos encontrado numerosas células PCNA⁺ también en la CVM, lo cual parece indicar que, además de ser un un lugar de depósito de antígeno y migración celular, podría ser un lugar importante de proliferación celular (Fig. 18D). Curiosamente, algunas de estas células en fase proliferativa resultaron ser, además, células IgM⁺ (Fig. 18G) o IgT⁺ (Fig. 18E) dispersas. Sin embargo, existen otros tipos celulares en proliferación que aún deben ser identificados.

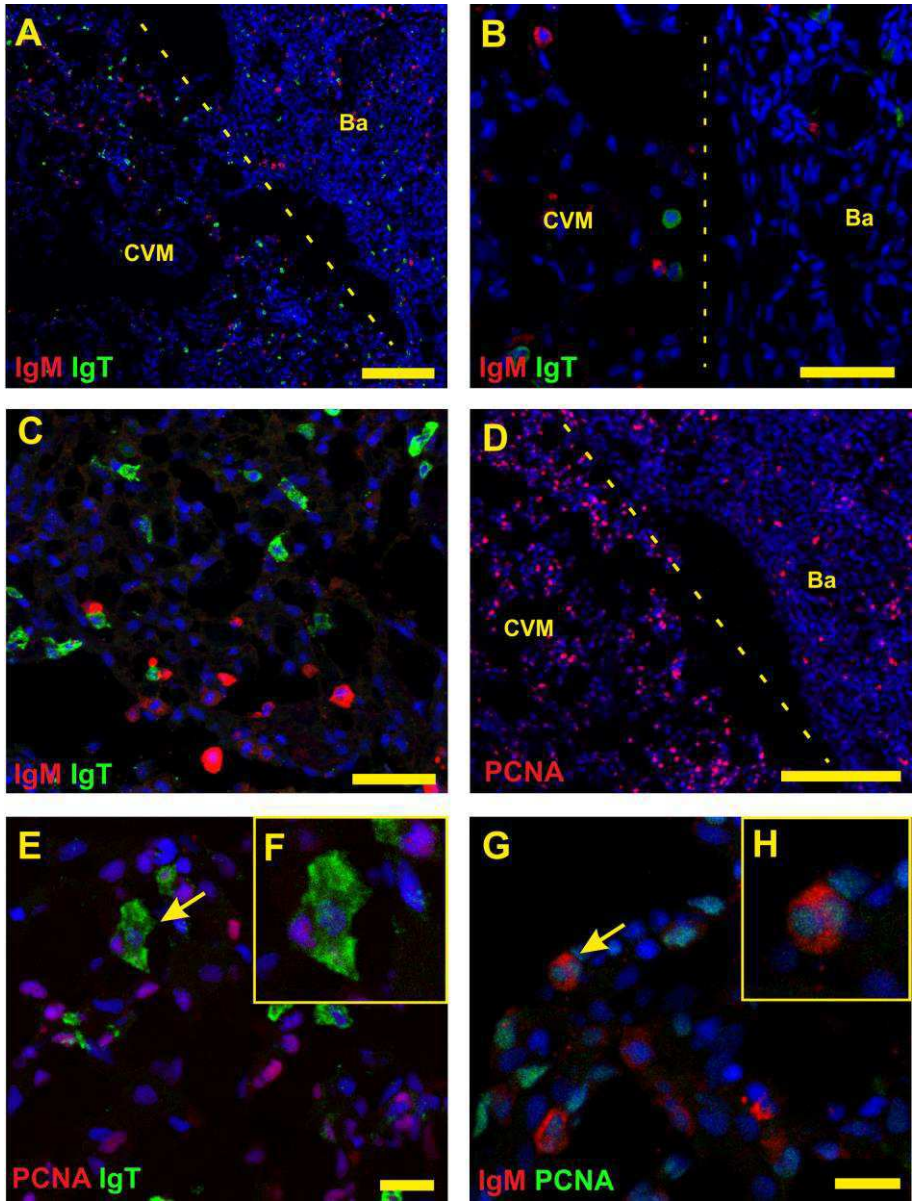


Fig 18. Fotomicrografías de secciones de masas de células y vacuna adyacentes a bazo de rodaballos vacunados. A, B y C: La masa de células y vacuna (CVM) presenta baja densidad celular con respecto al bazo, siendo algunas de estas células IgM^+ o IgT^+ . D: Numerosas células de la CVM aparecen en proliferación. E, F: En la CVM aparecen células IgT^+ e IgM^+ en proliferación. La línea discontinua separa la masa de vacuna y células (CVM) del bazo (Ba). En E y G se muestra el detalle de células IgT^+ e IgM^+ en proliferación respectivamente. Escala: A y D: 100 μm ; B y C: 25 μm ; E y F: 10 μm .

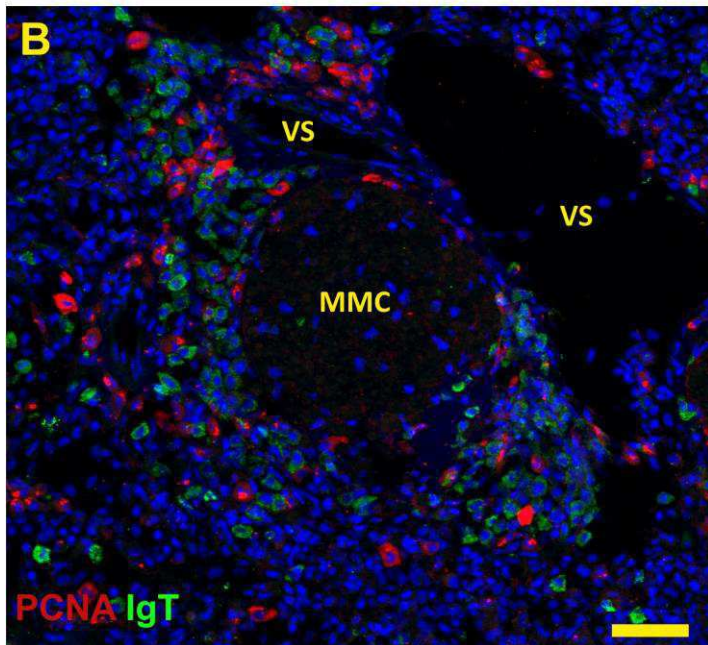
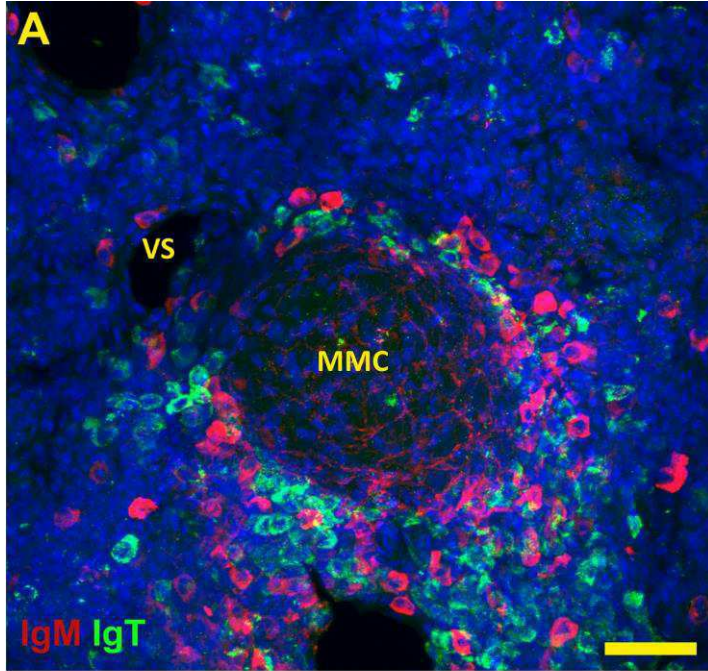
3.8. Distribución y proliferación de células B IgM^+ e IgT^+ en el bazo de peces supervivientes

También hemos estudiado por inmunofluorescencia el bazo de peces vacunados e infectados experimentalmente, pero que sobrevivieron a la infección, después de 21 días. El bazo de esos peces tenía numerosos MMCs de gran tamaño, la mayoría de ellos con un grupo compacto de melanomacrófagos y un área linfoide extensa que los rodeaba con abundantes células IgM^+ e IgT^+ (Fig. 19). En muchos de ellos las células IgM^+ e IgT^+ aparecieron alrededor del mismo MMC. Numerosas de estas células B IgM^+ e IgT^+ también fueron positivas para PCNA (Fig. 20), lo que indica que existe una intensa actividad proliferativa de esas células en el bazo de los peces supervivientes, que fue claramente mucho mayor que la proliferación encontrada en el bazo de peces vacunados en 7 y 30 días después de la dosis de refuerzo. El bazo de esos peces tenía numerosos granulomas asociados, como consecuencia de la reacción granulomatosa generada por la inyección de la vacuna, como se ha descrito anteriormente

(Noia *et al.*, 2014). Algunos de los granulomas tenían células B IgM⁺ o IgT⁺ en la periferia (Fig. 21), aunque la mayoría de los granulomas estaban libres de células Ig⁺. Las células IgM⁺ e Ig⁺ se observaron en el mismo granuloma, aunque en la mayoría de los casos se encontraron en la superficie de diferentes granulomas. También hemos encontrado células positivas para Ig⁺ en las áreas de contacto entre el tejido granulomatoso y el bazo, y esto fue especialmente evidente para las células IgT⁺ (Fig. 21). La actividad proliferativa de las células Ig⁺ en esas áreas fue muy baja, y solo se observaron células PCNA⁺ - Ig⁺ de forma ocasional.

Página siguiente:

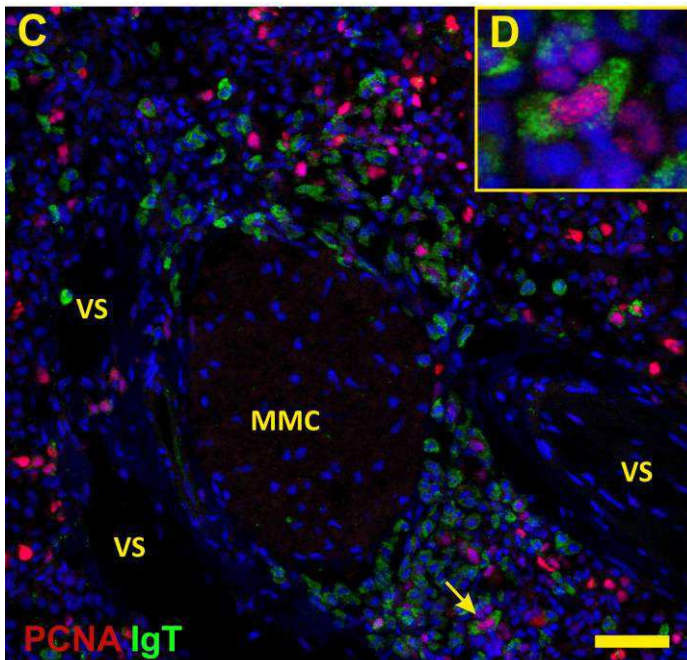
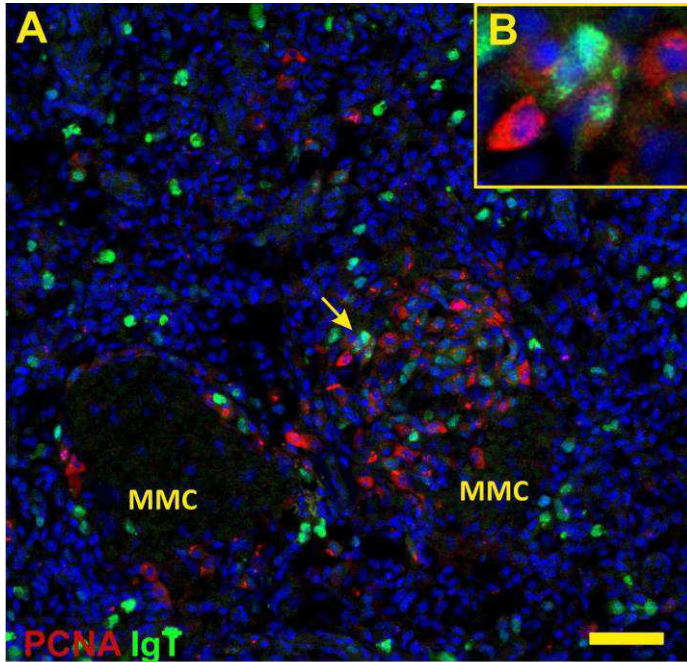
Fig 19. Fotomicrografías de secciones de bazo de rodaballos supervivientes a la infección experimental (21 días), mostrando la distribución de células IgM⁺ y células IgT⁺ alrededor de centros melanomacrofágicos (MMC) (A-B). Los centros se sitúan normalmente cerca de grandes vasos (VS). A: Sección de 80 μm que muestra una gran densidad de células IgM⁺ e IgT⁺ alrededor de un MMC. Escala: 25 μm.



Las células IgM^+ e Ig^+ podrían encontrarse en el mismo granuloma, aunque en la mayoría de los casos se encontraron en la superficie de diferentes granulomas. También hemos encontrado células positivas para Ig^+ en las áreas de contacto entre el tejido granulomatoso y el bazo, y esto fue especialmente evidente para las células IgT^+ (Fig. 21). La actividad proliferativa de las células Ig^+ en esas áreas fue muy baja, y solo se observaron células $PCNA^+ - Ig^+$ de forma ocasional.

Página siguiente:

Fig 20. Fotomicrografías de secciones de bazo de rodaballos supervivientes a los 21 días de la infección mostrando la distribución de células IgM^+ y células IgT^+ (A-B) y células IgM^+ (C) o IgT^+ (D) en proliferación. A: Las células IgM^+ e IgT^+ se disponen alrededor de los MMCs. B: Detalle de un MMC con abundantes células IgM^+ . C: Abundantes células IgM^+ en proliferación. D: Células IgT^+ proliferando alrededor de un MMC (flecha). Escala: A, B y D 25 μm ; C 10 μm .



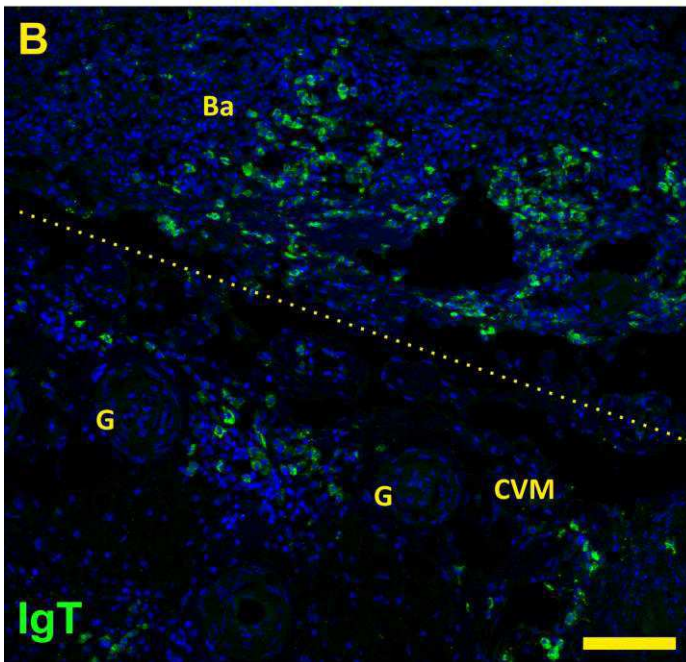
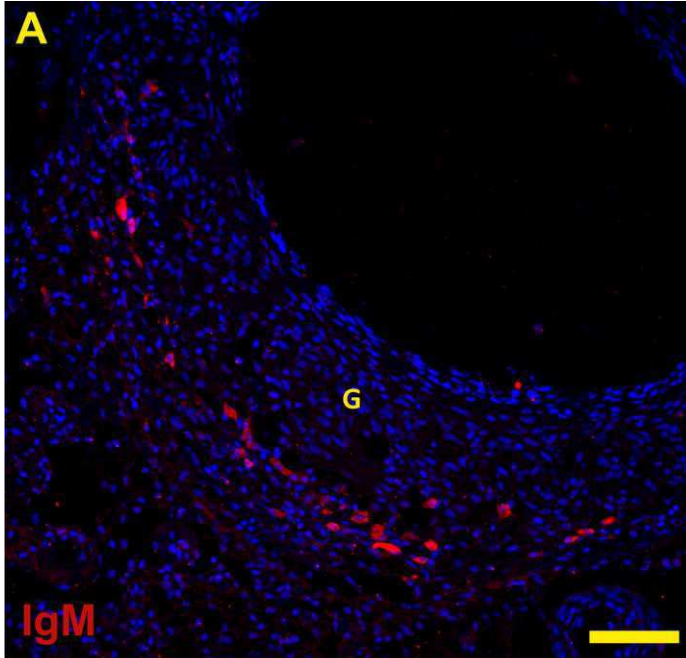


Fig 21. Fotomicrografías de secciones de bazo y/o masas de células y vacuna (CVM) de rodaballos supervivientes, a los 21 días de la inoculación mostrando la distribución de células IgM⁺ (A) IgT⁺ (C). A: Varias células IgM⁺ en la pared de un granuloma (G) de la CVM. B: Las células IgT⁺ también se han encontrado en zonas de contacto entre los cúmulos de células y vacuna y el bazo (Ba). La línea discontinua separa el bazo de la CVM. Escala: 50 μ m.

3.9. Expresión de inmunoglobulinas en el bazo de peces vacunados

Se ha analizado el patrón de expresión de *migt*, *sigt*, *migm*, *sigm* e *igd* en el bazo de los peces inyectados para determinar la respuesta de estos genes frente a la vacunación. La *migm* (Fig. 22) muestra un leve descenso en la expresión en el grupo de vacuna a 3 días y 7 días después de la inyección, mientras que en el grupo adyuvante solo se observa a los 3 días. La *sigm* (Fig. 23) disminuye en el grupo de vacuna a 7 días después de la inyección y en los grupos antígeno, adyuvante a 37 días. La *migt* (Fig. 24) disminuye a 6 h, 3d y 7d después de la inyección en el grupo vacuna. A 7 días la expresión de este gen también disminuye en el grupo adyuvante. La *sigt* (Fig. 25) disminuye a 3 días en los grupos antígeno, adyuvante y vacuna, mientras que 7 días después de la vacunación, lo hace en los grupos adyuvante y vacuna. Curiosamente, la *sigt* muestra una clara regulación positiva en el grupo vacuna a 37 días de la vacunación. A los 60 días, aunque se observa un aumento de la expresión en el grupo vacuna, este no significativo. Se observaron cambios menores en la expresión de *igd* (Fig. 26). Ninguno de los genes se reguló a los 33 días.

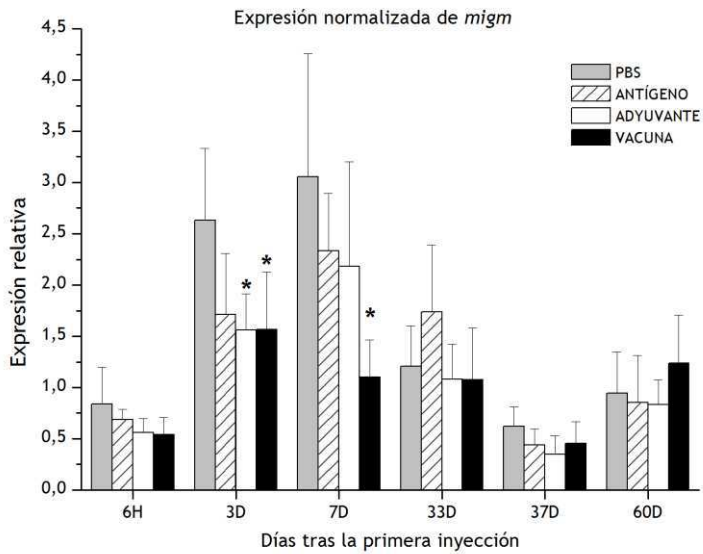


Fig. 22. Expresión normalizada del gen *migm* en bazo de rodaballo obtenida por medio de PCR en tiempo real. La expresión se ha normalizado con respecto al gen de la β -actina (n=10). Los datos se muestran como media \pm desviación estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas con respecto al grupo PBS a $p < 0,05$.

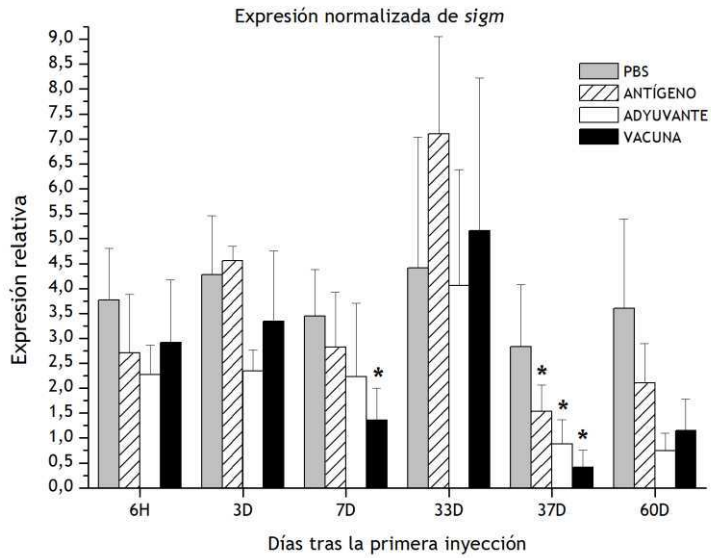


Fig. 23. Expresión normalizada del gen *sigm* en bazo de rodaballo obtenida por medio de PCR en tiempo real. La expresión se ha normalizado con respecto al gen de la β -actina (n=10). Los datos se muestran como media \pm desviación estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas con respecto al grupo PBS a $p < 0,05$.

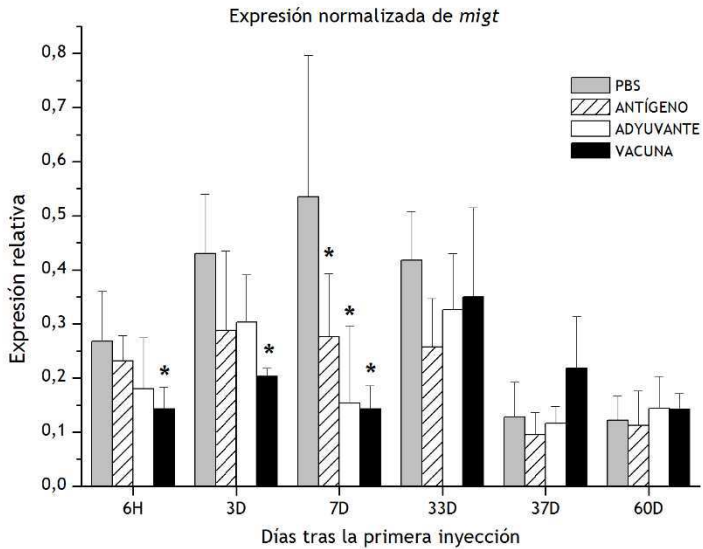


Fig. 24. Expresión normalizada del gen *migt* en bazo de rodaballo obtenida por medio de PCR en tiempo real. La expresión se ha normalizado con respecto al gen de la β -actina ($n=10$). Los datos se muestran como media \pm desviación estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas con respecto al grupo PBS a $p < 0,05$.

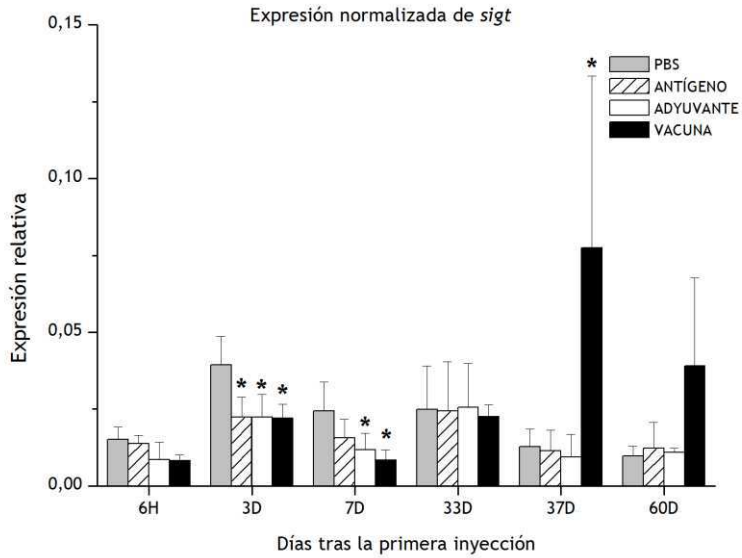


Fig. 25. Expresión normalizada del gen *sigt* en bazo de rodaballo obtenida por medio de PCR en tiempo real. La expresión se ha normalizado con respecto al gen de la β -actina ($n=10$). Los datos se muestran como media \pm desviación estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas con respecto al grupo PBS a $p<0,05$.

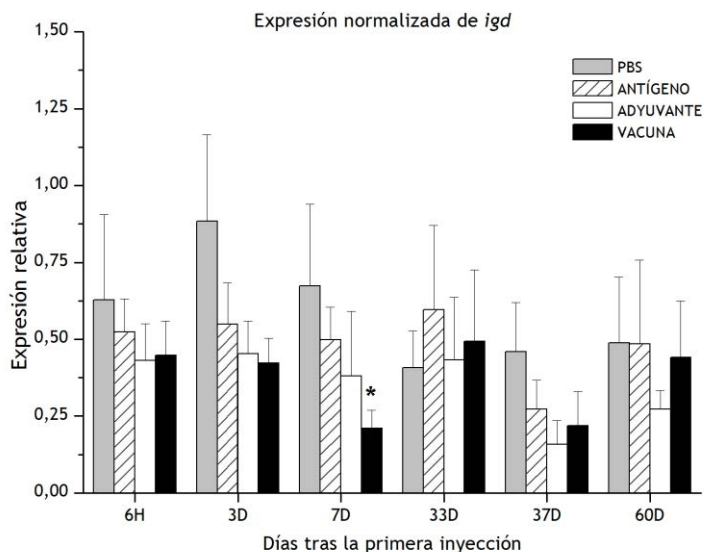


Fig. 26. Expresión normalizada del gen *igd* en bazo de rodaballo obtenida por medio de PCR en tiempo real. La expresión se ha normalizado con respecto al gen de la β -actina ($n=10$). Los datos se muestran como media \pm desviación estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas con respecto al grupo PBS a $p<0,05$.

3.10. Evaluación de la expresión de varios genes relacionados con el sistema inmunitario en el bazo de peces vacunados

En el bazo de rodaballos se ha evaluado, mediante RT-qPCR, la expresión de genes que se han asociado a respuestas de células T: Th1 (*tbx21*, *ifng*), Th2 (*gata3*, *il6*), Treg (*il10*), receptor de células T (*tcr*); a respuestas proinflamatorias (*tnfa*) y a la presentación de antígeno (*mhcii*) (Tabla 4). Es destacable que el número de genes

regulados tanto positivamente como negativamente es muy bajo a todos los tiempos estudiados: 6 h, 3 d, 7 d, 33 d, 37 d y 60 d. A 6 h después de la inyección no se reguló ninguno de los genes analizados con ninguno de los tratamientos. Curiosamente, el adyuvante y la vacuna regulan negativamente los genes *mhcii*, *tcr*, *tbx21*, *gata3* e *il6* a varios tiempos. El antígeno apenas tiene efecto sobre la expresión de los genes analizados, siendo capaz de modular negativamente la *il6* a 37 d después de la vacunación y el *ifng* positivamente a 33 d después de la vacunación. Además, el grupo vacuna regula positivamente los genes *tbx21* e *ifng* a 60 y 33 días de la primera dosis, respectivamente. A pesar de los fuertes cambios producidos en la cavidad peritoneal durante la vacunación, no se regula la citocina proinflamatoria *tnfa*.

	<i>tbox21</i>	<i>gata3</i>	<i>il6</i>	<i>ifng</i>	<i>tnfa</i>	<i>il10</i>	<i>tcr</i>	<i>mhci1</i>
6h	PBS	0,0099 ± 2,87E-03	0,00112 ± 1,77E-04	0,0041 ± 6,47E-04	0,00904 ± 5,94E-04	0,0012 ± 7,23E-04	0,0029 ± 1,20E-03	1,71 ± 3,84E-01
	Antígeno	0,0074 ± 1,01E-03	0,00022 ± 4,26E-05	0,0039 ± 1,01E-03	0,01025 ± 1,94E-03	0,0027 ± 1,34E-03	0,0023 ± 7,62E-04	1,30 ± 2,27E-01
	Adyuvante	0,0093 ± 3,53E-03	0,00030 ± 9,44E-05	0,0026 ± 7,49E-04	0,00947 ± 2,96E-03	0,0009 ± 5,89E-04	0,0030 ± 9,89E-04	1,32 ± 3,67E-01
	Vacuna	0,0083 ± 1,88E-03	0,00027 ± 6,93E-05	0,00098 ± 1,24E-04	0,00768 ± 2,61E-03	0,0013 ± 7,59E-04	0,0026 ± 4,99E-04	1,24 ± 2,19E-01
3d	PBS	0,0117 ± 2,47E-03	0,00027 ± 6,95E-05	0,0050 ± 1,44E-03	0,00975 ± 3,18E-03	0,0020 ± 1,39E-03	0,0026 ± 3,63E-04	2,56 ± 6,36E-01
	Antígeno	0,0133 ± 4,77E-03	0,00033 ± 7,18E-05	0,0111 ± 1,11E-02	0,01384 ± 4,19E-03	0,0021 ± 2,34E-03	0,0031 ± 7,31E-04	2,14 ± 6,23E-01
	Adyuvante	0,0106 ± 2,37E-03	0,00029 ± 2,89E-05	0,0030 ± 1,12E-03	0,00768 ± 1,96E-03	0,0026 ± 1,33E-03	0,0023 ± 3,36E-04	0,90 ± 1,84E-01
	Vacuna	0,0078 ± 1,35E-03	0,00026 ± 6,74E-05	0,0040 ± 4,76E-04	0,00865 ± 4,32E-03	0,0019 ± 8,07E-04	0,0017 ± 4,42E-04	1,11 ± 2,40E-01
7d	PBS	0,0179 ± 6,17E-03	0,00033 ± 6,09E-05	0,0029 ± 1,12E-03	0,00709 ± 1,72E-03	0,0022 ± 1,92E-03	0,0029 ± 4,46E-04	1,94 ± 5,48E-01
	Antígeno	0,0159 ± 4,70E-03	0,00029 ± 6,69E-05	0,0071 ± 2,18E-04	0,00345 ± 8,89E-04	0,0018 ± 4,14E-04	0,0040 ± 1,37E-03	2,48 ± 8,15E-01
	Adyuvante	0,0098 ± 4,60E-03	0,00017 ± 4,37E-05	0,00099 ± 2,40E-04	0,0033 ± 1,04E-03	0,0017 ± 7,56E-04	0,0018 ± 5,13E-04	1,19 ± 3,50E-01
	Vacuna	0,0070 ± 1,29E-03	0,00020 ± 6,60E-05	0,0070 ± 7,91E-05	0,0029 ± 8,26E-04	0,00646 ± 3,61E-03	0,0013 ± 5,21E-04	0,93 ± 4,58E-01
33d	PBS	0,0113 ± 3,47E-03	0,00036 ± 8,19E-05	0,0017 ± 1,71E-04	0,00710 ± 3,51E-03	0,0019 ± 7,92E-04	0,0033 ± 9,66E-04	3,11 ± 1,04E+00
	Antígeno	0,0152 ± 3,18E-03	0,00045 ± 1,00E-04	0,00253 ± 5,26E-04	0,00815 ± 2,58E-03	0,0023 ± 8,04E-04	0,0054 ± 2,00E-03	5,15 ± 2,19E+00
	Adyuvante	0,0113 ± 2,90E-03	0,00050 ± 2,72E-04	0,00218 ± 7,43E-04	0,00312 ± 1,25E-03	0,0021 ± 1,17E-03	0,0028 ± 1,45E-03	1,86 ± 6,68E-01
	Vacuna	0,0124 ± 3,66E-03	0,00053 ± 2,39E-04	0,00191 ± 4,44E-04	0,0027 ± 1,10E-03	0,00491 ± 1,93E-03	0,0030 ± 2,03E-03	2,20 ± 6,71E-01
37d	PBS	0,0085 ± 1,24E-03	0,00022 ± 6,89E-05	0,0027 ± 1,06E-03	0,00605 ± 1,72E-03	0,0014 ± 7,20E-04	0,0056 ± 1,81E-03	1,91 ± 6,49E-01
	Antígeno	0,0104 ± 4,88E-03	0,00016 ± 3,57E-05	0,0059 ± 5,57E-03	0,00998 ± 3,43E-03	0,0026 ± 1,82E-03	0,0050 ± 2,43E-03	2,08 ± 5,60E-01
	Adyuvante	0,0103 ± 4,99E-03	0,00019 ± 6,28E-05	0,0063 ± 4,91E-03	0,00677 ± 1,41E-03	0,0035 ± 1,93E-03	0,0058 ± 3,20E-03	1,38 ± 4,13E-01
	Vacuna	0,0078 ± 1,25E-03	0,00019 ± 3,99E-05	0,0034 ± 7,35E-04	0,00625 ± 6,45E-03	0,0034 ± 2,16E-03	0,0036 ± 1,09E-03	1,15 ± 3,02E-01
60d	PBS	0,0067 ± 1,91E-03	0,00018 ± 6,24E-05	0,0027 ± 4,65E-04	0,00791 ± 1,91E-03	0,0023 ± 5,68E-04	0,0039 ± 1,94E-03	2,41 ± 2,24E-01
	Antígeno	0,0090 ± 2,33E-03	0,00017 ± 4,34E-05	0,0024 ± 5,21E-04	0,00767 ± 1,97E-03	0,0017 ± 7,16E-04	0,0057 ± 2,39E-03	2,33 ± 4,05E-01
	Adyuvante	0,0118 ± 5,12E-03	0,00019 ± 7,48E-05	0,0030 ± 9,90E-04	0,00575 ± 1,42E-03	0,0032 ± 1,66E-03	0,0046 ± 1,25E-03	1,56 ± 6,78E-01
	Vacuna	0,0147 ± 5,71E-03	0,00019 ± 2,72E-05	0,0032 ± 1,13E-03	0,00767 ± 3,60E-03	0,0033 ± 9,81E-04	0,0062 ± 2,74E-03	1,57 ± 8,74E-01



Tabla 4. Expresión normalizada de varios genes relacionados con el sistema inmunitario en bazo de rodaballo obtenida por medio de PCR en tiempo real. La expresión se ha normalizado con respecto al gen de la β actina (*actb*). *tbx21*: factor de transcripción caja T 21; *gata3*: proteína 3 de unión a la secuencia de ADN GATA; *il10*: interleucina 10; *ifng*: interferón γ ; *tnfa* (factor de necrosis tumoral α); *il6*: interleucina 6; *tcr*: receptor de células T (cadena α); *mhcii* (molécula de histocompatibilidad de tipo 2 (cadena α). Los datos se muestran como media \pm desviación estándar (n=10). Los números resaltados en rojo y verde indican sobreexpresión e infraexpresión, respectivamente, con respecto a cada grupo PBS. Las diferencias se han considerado significativas con $p < 0,05$.

4. Discusión

Los peces mandibulados son el grupo más antiguo de organismos que poseen un sistema inmunitario adquirido que presenta inmunoglobulinas. En este trabajo hemos analizado la respuesta inmunitaria en el bazo de *S. maximus* durante la vacunación con el parásito facultativo *P. dicentrarchi*, centrándonos en la regulación de las inmunoglobulinas IgM, IgT e IgD y de otros genes relacionados con la respuesta inmunitaria innata y adaptativa, analizando, además, el comportamiento de las poblaciones de células Ig⁺.

Durante las dos últimas décadas el estudio de los genes de las inmunoglobulinas de peces ha experimentado un auge debido, en parte, a la importancia de estas en la lucha contra patologías provocadas por microorganismos. Los peces tienen tres clases de inmunoglobulinas, denominadas IgM, IgD e IgT. La IgM e IgD se consideran las más primitivas y se han identificado en numerosos grupos de vertebrados mandibulados, incluidos los elasmobranquios,

en los que se ha identificado un ortólogo de la IgD denominado IgW (Fillatreau *et al.*, 2013). Sin embargo, la IgT es una inmunoglobulina exclusiva de teleosteos que se ha relacionado con respuestas de la inmunidad de mucosas que, curiosamente, no es un ortólogo de la IgA de mamíferos (Zhang *et al.*, 2010). La secuenciación del genoma de muchos vertebrados marinos evolutivamente relevantes, tales como rodaballo (Figueras *et al.*, 2016), tiburón elefante (*Callorhinchus milii*) (Venkatesh *et al.*, 2014) o el catán pinto (*Lepisosteus oculatus*) (Braasch *et al.*, 2016) permite el estudio de la regulación génica en diversas condiciones, tales como vacunaciones o inmunizaciones, de una forma relativamente sencilla. Sin embargo, la mayor parte de los avances en inmunología requieren el empleo de anticuerpos que puedan identificar y/o separar distintas poblaciones celulares (Dixon *et al.*, 2018). En *S. maximus* los anticuerpos disponibles son muy limitados, especialmente los relacionados con las células B. En este trabajo hemos desarrollado un anticuerpo anti-IgT que reconoce de forma específica la IgT de rodaballo en Western blot y que marca células en inmunofluorescencia compatibles con células B. En base a la secuencia del ADNc, la forma secretada de la IgT tiene un peso molecular esperado de 60,94 kDa en el fletán *P. olivaceus* (Du *et al.*, 2016), 61,92 kDa en rodaballo (Tang *et al.*, 2018) o 58 kDa en pez cebra (*Danio rerio*) (Hansen *et al.*, 2005). El anticuerpo anti-IgT desarrollado en este estudio marca una banda en Western blot de alrededor de 70 kDa en suero reducido de rodaballo, que ha sido

confirmada como la cadena pesada de la IgT mediante espectrometría de masas. Este peso molecular es similar al observado en trucha arcoíris (*Onchorynchus mykiss*) (~75 kDa) (Zhang *et al.*, 2010) o en dorada (*Sparus aurata*) (~65 kDa) (Piazzon *et al.*, 2016).

A pesar de que el bazo se considera el órgano linfoide periférico más importante de los peces, las poblaciones de células B, especialmente las IgT⁺, presentes en él no han sido muy estudiadas. En este trabajo hemos estudiado detalladamente, por medio de inmunofluorescencia, la distribución de células Ig⁺ en peces no inyectados, inmunizados o supervivientes a una infección con *P. dicentrarchi*. Las células B IgM⁺ de bazo se encontraron principalmente en grupos en las paredes de los vasos sanguíneos y alrededor de los centros melanomacrofágicos en peces sin inmunizar, en peces vacunados y en peces supervivientes a la infección con *P. dicentrarchi*. Esto coincide con estudios previos llevados a cabo en rodaballos no inmunizados (Fournier-Betz *et al.*, 2000) o en rodaballos infectados con *Enteromyxum scophthalmi* (Bermúdez *et al.*, 2006). Aunque existe variabilidad entre especies, las células B IgM⁺ son abundantes en el bazo de teleósteos, suponiendo un 33% de las células totales en la corvina japonesa (*Larimichthys crocea*) (Huang *et al.*, 2019), 20,6% en *Cynoglossus semilaevis* (Yang *et al.*, 2017) o 21,1 % en el serránido japonés (*Lateolabrax japonicus*) (Yang *et al.*, 2018). Aunque no hemos realizado estudios de citometría flujo, observamos una elevada cantidad de células IgM⁺ en el bazo.

Las células IgT^+ B se han descrito inicialmente en las mucosas de peces, por lo que se han asociado a respuestas de la inmunidad de mucosa (Zhang *et al.*, 2010; Salinas *et al.*, 2011; Ballesteros *et al.*, 2013; Parra *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2018). Sin embargo, las células B IgT^+ también se describieron en órganos linfoides secundarios como el bazo. Por ejemplo, en la lubina (*Dicentrarchus labrax*), aproximadamente el 4% de las células del bazo son células B IgT^+ (Picchietti *et al.*, 2017). Además, en concordancia con lo que hemos observado, el número de células IgM^+ es mayor que el número de IgT^+ , suponiendo un 74,8% y un 25,2% del total de células B, respectivamente, en el bazo de trucha arcoíris (Zhang *et al.*, 2010). Otro estudio observó porcentajes parecidos, encontrando un 75–90% de células B IgM^+ y un 25–10% de células B IgT^+ . En este mismo estudio, se ha observado que en el bazo se dan respuestas clonales de células IgM^+ e IgT^+ en respuesta a infecciones víricas, sin aumentar el número total de células tras un análisis con citometría de flujo (Castro *et al.*, 2013). Todo esto sugiere que las células B IgT^+ también pueden ser importantes en la respuesta inmune sistémica. En este trabajo hemos observado un aumento de células IgT^+ en respuesta a vacunación y, en mucha mayor medida, en respuesta a la infección con *P. dicentrarchi*. Además, hemos observado que, al igual que las células IgM^+ , las células IgT^+ proliferan principalmente en el tejido linfoide asociado a los centros melanomacrofágicos. Las células IgT^+ las hemos observado principalmente en los mismos sitios que las

células IgM⁺. Se encontraron principalmente en un área adyacente a los MMCs, generalmente formando pequeños grupos cerca de los grupos de melanomacrófagos, y en las paredes de los vasos sanguíneos principales.

La inyección intraperitoneal de los peces generó una masa de células y vacuna (CVM) formada por células con morfología tipo macrófago y células con características de linfocitos de acuerdo a lo descrito previamente (Noia *et al.*, 2014). Aunque se ha hablado de la importancia de los adyuvantes provocando un efecto depósito para la liberación sostenida del antígeno, su papel en el aumento de la presentación de antígeno o en la migración de células al lugar de inyección (Awate *et al.*, 2013), hasta donde sabemos, no hay estudios que analicen las CVM formadas en peces tras la vacunación. En este trabajo, hemos observado que parte de las células linfoides asociadas a las CVM son IgM⁺ o IgT⁺. Curiosamente, muchas de las células de las CVM se encuentran en estado proliferativo. Esto nos indica que no es una simple zona de depósito de material, pudiendo llevarse a cabo importantes acontecimientos de las respuestas inmunitarias, como, por ejemplo, la presentación de antígeno. De hecho, algunas de estas células en estado de proliferación son células IgM⁺ o IgT⁺ que, al contrario de lo que observamos en el bazo, en donde se observan grupos de células en proliferación alrededor de los MMCs, se encuentran dispersas a lo largo de la CVM. Durante la estimulación intraperitoneal con diversos antígenos se ha observado que el número

de células IgM^+ aumenta en la cavidad peritoneal (Castro *et al.*, 2017). Es posible que estas células que migran a la cavidad acaben formando parte de las CVM. Es importante señalar que las células B de peces presentan actividad fagocítica y pueden actuar como células presentadoras de antígeno (Li *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010; Sunyer, 2012), por lo que su presencia podría estar relacionada con estas funciones. Se ha propuesto que las células B IgM^+ presentes en la cavidad peritoneal pueden proliferar sin que medie el BCR y producir anticuerpos naturales IgM (Sunyer, 2013). Es posible que las células B en proliferación que hemos identificado en la CVM hayan proliferado en respuesta al antígeno del ciliado sin mediar el BCR. Además, las células B IgT^+ podrían comportarse como las B IgM^+ y producir anticuerpos naturales, de forma análoga a lo observado en las células IgA^+ de mamíferos (Bunker *et al.*, 2017). Aunque no se ha llevado a cabo en este estudio, sería interesante determinar si las células B presentes en la MCV en el grupo inyectado con adyuvante se encuentran en proliferación. Sin embargo, la función y origen de estas células deben ser dilucidados en trabajos posteriores.

Aunque esperábamos observar una mayor regulación positiva de los genes de las inmunoglobulinas durante la vacunación, cuando analizamos el bazo solo hemos observado sobreexpresión de la *migt* y de la *sigt* a tiempos largos, observando incluso una infraexpresión de *migm* y *sigm* a tiempos cortos, que, de todas formas, resultó ser muy baja. La mayor parte de la información disponible sobre expresión de

inmunoglobulinas en peces es relativa a la IgM, siendo mucho más escasa en relación a la IgT. La respuesta de las inmunoglobulinas a un inmunógeno presenta mucha variabilidad, dependiendo de la ruta de vacunación y del tipo de inmunógeno, entre otros factores. Aunque hay abundante bibliografía que constata un aumento de la expresión de IgM en bazo de peces vacunados (Xu *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2018; Xing *et al.*, 2018), también hay ejemplos en donde no se observa regulación de las mismas o que incluso observan infraexpresión, como en nuestro caso. La vacunación intraperitoneal provocó un descenso de la expresión de *sigm* y no se apreció regulación significativa de *migm* en el bazo de rodaballo (Gao *et al.*, 2014). En truchas arcoíris inmunizadas con dos vacunas, una intraperitoneal y otra por baño, con *Yersinia ruckeri* inactivada, no se observó regulación de *igm* en bazo (Raida y Buchman, 2007; Raida y Buchman, 2008). En este trabajo hemos observado regulación positiva de la *sigt*, pero no de la *migt*. Como ocurre con los genes de la IgM, existe mucha variabilidad sobre la expresión. Por ejemplo, se ha observado una regulación positiva de la *igt* al día 2 y 14 de la inmunización en el bazo de truchas inmunizadas con una vacuna intraperitoneal frente a *Yersinia ruckeri* (Raida y Buchman, 2007). En rodaballo, se ha observado un aumento de la expresión de los genes de las mIgT y sIgT en el bazo cuando se vacunaron intraperitonealmente o mediante baño con *Vibrio anguillarum* (Tang *et al.*, 2018). También se ha documentado que el nivel de transcritos de Igs puede no variar

en el bazo durante la vacunación. Por ejemplo, Jørgensen *et al.* (2008) empleando una vacuna viva intraperitoneal contra *Ichthyophthirius multifiliis* en trucha arcoíris, no encontraron regulación de *igm* o *igt* en el bazo a 24 h, 1, 2 y 3 semanas de la vacunación. El descenso de la expresión de la IgM en el bazo de peces inyectados con antígeno, adyuvante o vacuna podría deberse a una migración de células IgM⁺ desde el bazo a la cavidad peritoneal que redujese el número de células presentes en el primero y provocase un descenso de la expresión en el bazo. En línea con esta explicación, se ha determinado que a los 2 días de una inyección intraperitoneal con *Aeromonas salmonicida* en trucha arcoíris, una gran proporción de células de la cavidad peritoneal son células B IgM⁺ (Korytář *et al.*, 2013). Algo similar ocurrió en trucha tras la inyección intraperitoneal con varios antígenos, donde uno de los grupos mayoritarios eran también las células B IgM⁺ (Castro *et al.*, 2017). Es posible que la vacunación intraperitoneal genere una migración de linfocitos B del bazo a la cavidad, lo que, junto a un incremento en la población de macrófagos en el bazo, favorezca que la proporción de células B disminuya con respecto a los grupos PBS y, por consiguiente, también la expresión inmunoglobulinas.

Cuando analizamos la expresión de varios genes relacionados con las respuestas Th durante la vacunación, solo encontramos regulación positiva del gen *ifnγ* en los grupos antígeno y vacuna, a los 33 días y de *tbet* en el grupo vacuna, a los 60 días. Los dos genes están

relacionados con las respuestas Th1 (Zou y Secombes, 2016). Esta baja regulación de todos los genes analizados podría deberse al tiempo de muestreo, que quizás no sea el apropiado para evaluar la expresión de esos genes, o a que la mayor parte de la regulación génica se produce en la cavidad peritoneal y no en los órganos. Esto es algo que necesita ser aclarado en futuras investigaciones.

La ausencia de centros germinales en peces plantea la cuestión sobre si en este grupo existen sitios específicos donde se produzca la expansión clonal y otros procesos relacionados con estos centros. Muchos estudios han sugerido la existencia de similitudes entre los centros melanomacrófagos y los centros germinales de mamíferos (ver revisión de Steinel y Bolnick, 2017). El término MMC se ha asociado a agregaciones de macrófagos pigmentados, o melanomacrófagos, que se pueden encontrar principalmente en el riñón y el bazo, pero también en otros órganos como el hígado (Agius y Agbede, 1984; Zapata y Cooper, 1990; Steinel y Bolnick, 2017).

En este contexto, creemos que no es posible establecer una asociación directa entre GC y MMC. Sin embargo, también creemos que si consideramos los MMCs y la población de células linfoides y no linfoides que está asociada a ellos, es posible encontrar muchas semejanzas entre los MMCs de algunas especies de peces y los GC de mamíferos. Los MMCs de bazo están poco desarrollados en salmónidos (Zapata y Cooper, 1990) y los MMCs de lubina y dorada tienen una cápsula de células aplanadas (Meseguer *et al.*, 1994); en

carpín dorado están asociados con células linfoides, aunque el tejido linfoide está poco desarrollado (Herráez y Zapata, 1986), y algunas especies de peces planos muestran una vaina de linfocitos que rodea a los MMCs (Ellis, 1974; Ferguson, 1976). En rodaballo, también se observa que los MMCs llevan asociada una zona de tejido linfoide, que puede ocupar un espacio relativamente grande y que está delimitada por células aplanadas. El tejido asociado a los MMCs contiene linfocitos B IgM^+ e IgT^+ , pero también otros tipos de células que aún están pendientes de caracterizar. Un alto porcentaje de esas células B se encuentra en estado proliferativo. Además, el número de células B IgM^+ e IgT^+ aumentó considerablemente en los peces vacunados expuestos a *P. dicentrarchi*. Por otra parte, además de las células B IgM^+ e IgT^+ , observamos que rodeando a los MMCs de rodaballo aparecen otros tipos celulares con alta actividad proliferativa que deben caracterizarse en futuros estudios. Los MMCs de rodaballo y el tejido asociado tienen muchas similitudes con los GC de mamíferos. Las células B de los GC expresan desaminasa de citidina inducida por activación (AID), que es una enzima clave implicada en la hipermutación somática (SHM) y la recombinación de cambio de clase (CSR). Esta enzima produce mutaciones en las células B que conducen a su maduración por afinidad (Victora y Nussenzweig, 2012). Recientemente, se identificó un gen homólogo de *aid* en varias especies de teleósteos (revisado en Magor, 2015). Aunque se sabe que los peces carecen de CSR (Stavnezer y Amemiya, 2004), su Aid

puede catalizar la recombinación de cambio de clase en células de ratón, lo que indica que este homólogo de la AID de mamíferos es una enzima completamente funcional en estos peces (Wakae *et al.*, 2005). Saunders *et al.* (2010) estudiaron el patrón de expresión de AID en bazo de *Ictalurus punctatus* durante la inmunización con seroalbúmina bovina con adyuvante de Freund como adyuvante, encontrando grupos de células que expresan ARNm de *aid* en o cerca de los centros melanomacrófagos. Algunos estudios han sugerido que los melanomacrófagos podrían desempeñar una función análoga a las células dendríticas foliculares. Las similitudes dentro de estos tipos celulares son abundantes. Por ejemplo, las células dendríticas foliculares retienen el antígeno que se presenta a las células B para llevar a cabo la selección de células B junto con la célula auxiliar folicular T (Tfh) (Crotty, 2014; Victora y Nussenzweig, 2012). En peces, varios estudios clásicos sobre los MMCs han observado que los melanomacrófagos y las células reticulares tienen la capacidad de retener el antígeno en su interior o cerca de ellas (Magor, 2015). Curiosamente, observamos una tinción suave de IgM⁺ en la membrana de algunos melanomacrófagos, aunque no en su citoplasma, especialmente en los bazos de peces supervivientes, que parece no corresponder con el fondo debido a la técnica y que podría deberse, en cambio, a la unión de IgM al receptor Fc, tal y como ocurre en las células dendríticas foliculares (FDC) de mamíferos (Victora y Nussenzweig, 2012). Otra evidencia adicional sobre

melanomacrófagos como análogos de las FDC es su clara tinción positiva en el bazo de la carpa común (*Cyprinus carpio*), el pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) y el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) con el anticuerpo monoclonal CNA-42, que reconoce un marcador de células FDC conservado en una gran variedad de especies (Vigliano *et al.*, 2006). Sin embargo, otros autores han establecido una relación entre las células reticulares y las FDC (Magor, 2015). Las células Tfh, ubicadas en la zona de luz de GC, son células T CD4⁺ necesarias para proporcionar señales de supervivencia y proliferación celular a las células B, estimular la SHM y la selección de células B con anticuerpos de alta afinidad (revisado en Crotty, 2014). Existen evidencias de que, también en los peces, las células T que expresan CD4 se encuentran rodeando a los MMCs. Por ejemplo, la microdissección de captura con láser y la RT-PCR de las células asociadas a los MMCs del bazo del pez gato (*Ictalurus punctatus*) muestra que algunas de estas células expresan ARNm de CD4 y *tcrlβ* (Saunders *et al.*, 2010). Además, la presencia de dos poblaciones mutuamente excluyentes de células que expresan ARNm de CD4-1 y CD4-2 se ha descrito en bazo del fletán *Paralichthys olivaceus*. Los melanomacrófagos son CD4-1⁺ y, formando grupos cerca de ellos, aparecieron células CD4-2⁺ (Kato *et al.*, 2013). Curiosamente, Takizawa *et al.* (2016) describieron una población de macrófagos CD4-1, por lo que los melanomacrófagos podrían expresarlo también. Además, el mismo grupo identificó una población de células T CD4-1⁻

/CD4-2⁺ que podrían corresponderse con las células Tfh. Finalmente, se sabe que existe una importante migración celular entre la cavidad peritoneal y los órganos linfoides, incluido el bazo (Folgueira *et al.*, 2015). Todas estas evidencias acumuladas por varios grupos y los resultados obtenidos en este trabajo indican que los centros melanomacrofágicos y las células que los rodean podrían ser los análogos de los centros germinales de mamíferos.

Por lo tanto, proponemos que, durante la inmunización intraperitoneal, las células B (IgM⁺ o IgT⁺) del bazo reconocen a su antígeno específico, que llega a través de la circulación o es presentado por células presentadoras de antígeno, y proliferan en el tejido linfoide asociado a los centros melanomacrofágicos, donde se lleva a cabo su expansión clonal y la maduración de la afinidad, ayudadas en este proceso por células que aún deben ser identificadas. Son necesarios trabajos adicionales para comprobar este modelo, tales como la demostración de la expansión clonal o que las células IgM⁺ e IgT⁺ proliferantes portan inmunoglobulinas específicas para el antígeno con el que se ha realizado la inmunización o establecer qué tipos celulares actúan como presentadores de antígeno. Finalmente, hemos establecido, sin lugar a dudas, que la proliferación de células B de peces ocurre fundamentalmente alrededor de los centros melanomacrofágicos en el bazo.

5. Bibliografía

- Abós, B., Castro, R., Pignatelli, J., Luque, A., González, L., Tafalla, C. (2013). Transcriptional heterogeneity of IgM⁺ cells in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues. PLoS One, 8(12): e82737 doi: 10.1371/journal.pone.0082737
- Abós, B., Estensoro, I., Perdiguero, P., Faber, M., Hu, Y., Rosales, P.D., Granja, A.G., Secombes, C.J., Holland, J.W., Tafalla, C. (2018). Dysregulation of B cell activity during proliferative kidney disease in rainbow trout. Front. Immunol., 9: 1203. doi: 10.3389/fimmu.2018.01203
- Agius, C., Agbede, S.A. (1984). An electron microscopical study on the genesis of lipofuscin, melanin and haemosiderin in the haemopoietic tissues of fish. J. Fish Biol., 24: 471-488. doi: 10.1111/j.1095-8649.1984.tb04818.x
- Agius, C., Roberts, R.J. (2003). Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. J. Fish Dis., 26(9): 499-509. doi: 10.1046/j.1365-2761.2003.00485.x
- Allen, C.D.C., Okada, T., Cyster, J.G. (2007). Germinal-center organization and cellular dynamics. Immunity, 27(2): 190-202. doi: 10.1016/j.immuni.2007.07.009
- Awate, S., Babiuk, L.A., Mutwiri, G. (2013). Mechanisms of action of adjuvants. Front. Immunol., 4: 114. doi: 10.3389/fimmu.2013.00114

- Ballesteros, N.A., Castro, R., Abos, B., Rodríguez Saint-Jean, S.S., Pérez-Prieto, S.I., Tafalla, C. (2013). The pyloric caeca area is a major site for IgM⁺ and IgT⁺ B cell recruitment in response to oral vaccination in rainbow trout. *PLoS One*, 8(6): e66118. doi: 10.1371/journal.pone.0066118
- Bermúdez, R., Vigliano, F., Marcaccini, A., Sitjà-Bobadilla, A., Quiroga, M.I., Nieto, J.M. (2006). Response of Ig-positive cells to *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) experimental infection in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.): A histopathological and immunohistochemical study. *Fish Shellfish Immunol.*, 21: 501-512. doi: 10.1016/j.fsi.2006.02.006
- Blanco-Abad, V., Noia, M., Valle, A., Fontenla, F., Folgueira, I, De Felipe, A.P., Pereiro, P., Leiro, J, Lamas, J. (2018). The coagulation system helps control infection caused by the ciliate parasite *Philasterides dicentrarchi* in the turbot *Scophthalmus maximus* (L.). *Dev. Comp. Immunol.*, 87: 147-156. doi: 10.1016/j.dci.2018.06.001
- Braasch, I., Gehrke, A.R., Smith, J.J., Kawasaki, K., Manousaki, T., Pasquier, J., Amores, A., Desvignes, T., Batzel, P., Catchen, J., Berlin, A.M., Campbell, M.S., Barrell, D., Martin, K.J., Mulley, J.F., Ravi, V., Lee, A.P., Nakamura, T., Chalopin, D., Fan, S., Weisel, D., Caestro, C., Sydes, J., Beaudry, F.E.G., Sun, Y., Hertel, J., Beam, M.J., Fasold, M., Ishiyama, M., Johnson, J., Kehr, S., Lara, M., Letaw, J.H., Litman, G.W., Litman, R.T.,

- Mikami, M., Ota, T., Saha, N.R., Williams, L., Stadler, P.F., Wang, H., Taylor, J.S., Fontenot, Q., Ferrara, A., Searle, S.M.J., Aken, B., Yandell, M., Schneider, I., Yoder, J.A., Volff, J.N., Meyer, A., Amemiya, C.T., Venkatesh, B., Holland, P.W.H., Guiguen, Y., Bobe, J., Shubin, N.H., Di Palma, F., Alföldi, J., Lindblad-Toh, K., Postlethwait, J.H. (2016). The spotted gar genome illuminates vertebrate evolution and facilitates human-teleost comparisons. *Nat. Genet.*, 48: 427-437. doi: 10.1038/ng.3526
- Bunker, J.J., Erickson, S.A., Flynn, T.M., Henry, C., Koval, J.C., Meisel, M., Jabri, B., Antonopoulos, D.A., Wilson, P.C., Bendelac, A. (2017). Natural polyreactive IgA antibodies coat the intestinal microbiota. *Science*, 358(6361).pii: eaan6619. doi: 10.1126/science.aan6619
- Buonocore, F., Stocchi, V., Nunez-Ortiz, N., Randelli, E., Gerdol, M., Pallavicini, A., Facchiano, A., Bernini, C., Guerra, L., Scapigliati, G., Picchiatti, S. (2017). Immunoglobulin T from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): Molecular characterization, tissue localization and expression after nodavirus infection. *BMC Mol. Biol.*, 18(1):8. doi: 10.1186/s12867-017-0085-0
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time

- PCR experiments. *Clin. Chem.*, 55(4): 611-622. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797
- Bustin, S.A., Wittwer, C.T. (2017). MIQE: A Step Toward More Robust and Reproducible Quantitative PCR. *Clin. Chem.*, 63(9): 1537-1538. doi: 10.1373/clinchem.2016.268953
- Castro, R., Jouneau, L., Pham, H.P., Bouchez, O., Giudicelli, V., Lefranc, M.P., Quillet, E., Benmansour, A., Cazals, F., Six, A., Fillatreau, S., Sunyer, O., Boudinot, P. (2013). Teleost fish mount complex clonal IgM and IgT responses in spleen upon systemic viral infection. *PLoS Pathog.*, 9(1): e1003098. doi: 10.1371/journal.ppat.1003098
- Castro, R., Bromage, E., Abós, B., Pignatelli, J., González Granja, A., Luque, A., Tafalla, C. (2014). CCR7 is mainly expressed in teleost gills, where it defines an IgD+IgM⁻ B lymphocyte subset. *J. Immunol.*, 192: 1257-1266. doi: 10.4049/jimmunol.1302471
- Castro, R., Abós, B., González, L., Granja, A.G., Tafalla, C. (2017). Expansion and differentiation of IgM⁺ B cells in the rainbow trout peritoneal cavity in response to different antigens. *Dev. Comp. Immunol.*, 70: 119-127. doi: 10.1016/j.dci.2017.01.012
- Crotty, S. (2014). T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity*, 41(4): 529-542. doi: 10.1016/j.immuni.2014.10.004

- Dixon, B., Barreda, D.R., Sunyer, J.O. (2018). Perspective on the development and validation of Ab reagents to fish immune proteins for the correct assessment of immune function. *Front. Immunol.*, 9: 2957. doi: 10.3389/fimmu.2018.02957
- Du, Y., Tang, X., Zhan, W., Xing, J., Sheng, X. (2016). Immunoglobulin tau heavy chain (IgT) in flounder, *Paralichthys olivaceus*: Molecular cloning, characterization, and expression analyses. *Int. J. Mol. Sci.*, 17(9), pii: E1571. doi: 10.3390/ijms17091571
- Edholm, E.-S., Bengtén, E., Stafford, J.L., Sahoo, M., Taylor, E.B., Miller, N.W., Wilson, M. (2010). Identification of two IgD + B cell populations in Channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J. Immunol.*, 185: 4082-4094. doi: 10.4049/jimmunol.1000631
- Ellis A.E. (1974). Aspects of the lymphoid and reticulo-endothelial system in the plaice *Pleuronectes platessa* L. PhD Thesis, University of Aberdeen.
- Ellis AE. (1980) Antigen-trapping in the spleen and kidney of the plaice *Pleuronectes platessa* L. *J. Fish Dis.*, 3: 413-426. doi: 10.1111/j.1365-2761.1980.tb00425.x
- Estévez, J., Leiro, J., Santamarina, M.T., Domínguez, J., Ubeira, F.M. (1994). Monoclonal antibodies to turbot (*Scophthalmus maximus*) immunoglobulins: characterization and applicability in immunoassays. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 41: 353-366. doi: 10.1016/0165-2427(94)90107-4

- Falk, K., Press, C.M.L., Landsverk, T., Dannevig, B.H. (1995). Spleen and kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) show histochemical changes early in the course of experimentally induced infectious salmon anaemia (ISA). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 49: 115-126. doi: 10.1016/0165-2427(95)05427-8
- Ferguson, H.W. (1976). The ultrastructure of plaice (*Pleuronectes platessa*) leucocytes. *J. Fish Biol.*, 8: 139-142. doi: 10.1111/j.1095-8649.1976.tb03927.x
- Figueras, A., Robledo, D., Corvelo, A., Hermida, M., Pereiro, P., Rubiolo, J.A., Gómez-Garrido, J., Carreté, L., Bello, X., Gut, M., Gut, I.G., Marcet-Houben, M., Forn-Cuní, G., Galán, B., García, J.L., Abal-Fabeiro, J.L., Pardo, B.G., Taboada, X., Fernández, C., Vlasova, A., Hermoso-Pulido, A., Guigó, R., Álvarez-Dios, J.A., Gómez-Tato, A., Viñas, A., Maside, X., Gabaldón, T., Novoa, B., Bouza, C., Alioto, T., Martínez, P. (2016). Whole genome sequencing of turbot (*Scophthalmus maximus*; Pleuronectiformes): A fish adapted to demersal life. *DNA Res.*, 23: 181-192. doi: 10.1093/dnares/dsw007
- Fillatreau, S., Six, A., Magadan, S., Castro, R., Sunyer, J.O., Boudinot, P. (2013). The astonishing diversity of Ig classes and B cell repertoires in teleost fish. *Front. Immunol.*, 4: 28. doi: 10.3389/fimmu.2013.00028

- Folgueira, I., Noia, M., Blanco-Abad, V., Mallo, N., Leiro, J., Lamas, J. (2015). Particle size and traffic of phagocytes between the turbot peritoneal cavity and lymphoid organs. *Fish Shellfish Immunol.*, 44: 652-661. doi: 10.1016/j.fsi.2015.03.034
- Fontenla, F., Blanco-Abad, V., Pardo, B.G., Folgueira, I., Noia, M., Gómez-Tato, A., Martínez, P., Leiro, J.M., Lamas, J. (2016). Vaccine-induced modulation of gene expression in turbot peritoneal cells. A microarray approach. *Mol. Immunol.*, 75: 188-199. doi: 10.1016/j.molimm.2016.06.001
- Fournier-Betz, V., Quentel, C., Lamour, F., Leven, A. (2000). Immunocytochemical detection of Ig-positive cells in blood, lymphoid organs and the gut associated lymphoid tissue of the turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Shellfish Immunol.*, 10: 187'-202. doi: 10.1006/fsim.1999.0235
- Gao, Y., Yi, Y., Wu, H., Wang, Q., Qu, J., Zhang, Y. (2014). Molecular cloning and characterization of secretory and membrane-bound IgM of turbot. *Fish Shellfish Immunol.*, 40: 354-361. doi: 10.1016/j.fsi.2014.07.011
- Grodzki, A.C., Berenstein, E. (2010). Antibody purification: ammonium sulfate fractionation or gel filtration. *Methods Mol. Biol.*, 588: 15-26. doi: 10.1007/978-1-59745-324-0_3
- Guo, M., Tang, X., Sheng, X., Xing, J., Zhan, W. (2018). The effects of IL-1 β , IL-8, G-CSF and TNF- α as molecular adjuvant on the immune response to an *E. tarda* subunit vaccine in flounder

- (*Paralichthys olivaceus*). Fish Shellfish Immunol., 77: 374-384. doi: 10.1016/j.fsi.2018.04.009
- Habeeb, A.F.S.A., Francis, R.D. (1976). Preparation of human immunoglobulin by ammonium sulfate precipitation. Vox Sang., 31: 423-434. doi: 10.1111/j.1423-0410.1976.tb04457.x
- Hansen, J.D., Landis, E.D., Phillips, R.B. (2005). Discovery of a unique Ig heavy-chain (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 102: 6919-6924. doi: 10.1073/pnas.0500027102
- Herráez, M.P., Zapata, A.G. (1986). Structure and function of the melano-macrophage centres of the goldfish *Carassius auratus*. Vet. Immunol. Immunopathol., 12: 117-126. doi: 10.1016/0165-2427(86)90116-9
- Hoare, R., Ngo, T.P.H., Bartie, K.L., 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.). Vet. Res., 48(1): 43. doi: 10.1186/s13567-017-0448-z
- Huang, Y., Yuan, X., Mu, P., Li, Q., Ao, J., Chen, X. (2019). Development of monoclonal antibody against IgM of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) and characterization of IgM+ B cells. Fish Shellfish Immunol., 91: 216-222. doi: 10.1016/j.fsi.2019.05.035

- Jørgensen, L.V.G., Nemli, E., Heinecke, R.D., Raida, M.K., Buchmann, K. (2008). Immune-relevant genes expressed in rainbow trout following immunisation with a live vaccine against *Ichthyophthirius multifiliis*. *Dis. Aquat. Organ.*, 80: 189-197. doi: 10.3354/dao01935
- Kato, G., Goto, K., Akune, I., Aoka, S., Kondo, H., Hirono, I. (2013). CD4 and CD8 homologues in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*: Differences in the expressions and localizations of CD4-1, CD4-2, CD8 α and CD8 β . *Dev. Comp. Immunol.*, 39: 293-301. doi: 10.1016/j.dci.2012.09.004
- Ko, K.Y., Ahn, D.U. (2007). Preparation of immunoglobulin Y from egg yolk using ammonium sulfate precipitation and ion exchange chromatography. *Poult. Sci.*, 86: 400-407. doi: 10.1093/ps/86.2.400
- Korytář, T., Jaros, J., Verleih, M., Rebl, A., Kotterba, G., Kühn, C., Goldammer, T., Köllner, B. (2013). Novel insights into the peritoneal inflammation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.*, 35: 1192-1199. doi: 10.1016/j.fsi.2013.07.032
- Lamas, J., Sanmartín, M.L., Paramá, A.I., Castro, R., Cabaleiro, S., Ruiz de Ocenda, M. V., Barja, J.L., 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: 22-26. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.03.015
- Lamers, C.H.J., De Haas, M.J.H. (1985). Antigen localization in the lymphoid organs of carp (*Cyprinus carpio*). *Cell Tissue Res.*, 242: 491-498. doi: 10.1007/BF00225413
- Leiro, J. , Piazzon, M.C., Budiño, B. , Sanmartín, M.L., Lamas, J. (2008). Complement-mediated killing of *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora) by turbot serum: relative importance of alternative and classical pathways. *Parasite Immunol.*, 30: 535-543. doi: 10.1111/j.1365-3024.2008.01052.x
- Li, J., Barreda, D.R., Zhang, Y.A., Boshra, H., Gelman, A.E., Lapatra, S., Tort, L., Sunyer, J.O. (2006). B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. Nat Immunol.*, 7(10): 1116-1124. doi: 10.1038/ni1389
- Li, J., Ma, S., Woo, N.Y.S. (2015). Vaccination of silver sea bream (*Sparus sarba*) against *Vibrio alginolyticus*: Protective evaluation of different vaccinating modalities. *Int. J. Mol. Sci.*, 17(1).pii: E40. doi: 10.3390/ijms17010040
- Lillehaug, A. (2014). Vaccination Strategies and Procedures. En: *Fish Vaccination*. Wiley Blackwell. pp. 140–152. doi: 10.1002/9781118806913.ch12

- Magor, B.G. (2015). Antibody affinity maturation in fishes-Our current understanding. *Biology (Basel)*, 4(3): 512-524. doi: 10.3390/biology4030512
- Mariam, S.H.S., Ooi, C.W., Tan, W.S., Janna, O.A., Arbakariya, A., Tey, B.T. (2015). Purification of rabbit polyclonal immunoglobulin G with ammonium sulphate precipitation and mixed-mode chromatography. *Sep. Purif. Technol.*, 144: 133-138. doi: 10.1016/j.seppur.2015.02.012
- Mashoof, S., Criscitiello, M.F. (2016). Fish immunoglobulins. *Biology (Basel)*, 5(4).pii: E45. doi: 10.3390/biology5040045
- Mebius, R.E., Kraal, G. (2005). Structure and function of the spleen. *Nat. Rev. Immunol.*, 5(8): 606-616. doi: 10.1038/nri1669
- Meseguer, J., López-Ruiz, A., Esteban, M.A. (1994). Melanomacrophages of the seawater teleosts, sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*): morphology, formation and possible function. *Cell Tissue Res.*, 277: 1-10. doi: 10.1007/BF00303074
- Mutoloki, S., Jorgensen, J.B., Evensen, O. (2014). The adaptive immune response in fish. En: *Fish Vaccination*. Gudding, R., Lillehaug, A., Evensen, O. (eds). Wiley Blackwell. John Wiley & Sons, West Sussex, UK. pp 104-115. doi: 10.1002/9781118806913.ch9

- Mesin, L., Ersching, J., Victora, G.D. (2016). Germinal center B cell dynamics. *Immunity*, 45(3): 471-482. doi: 10.1016/j.immuni.2016.09.001
- 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 Immunol.*, 38: 244-254. doi: 10.1016/j.fsi.2014.03.020
- Parra, D., Korytář, T., Takizawa, F., Sunyer, J.O. (2016). B cells and their role in the teleost gut. *Dev. Comp. Immunol.*, 64: 150-166. doi: 10.1016/j.dci.2016.03.013
- Piazzon, C., Lamas, J., Castro, R., Budiño, B., Cabaleiro, S., Sanmartín, M., Leiro, J. (2008). Antigenic and cross-protection studies on two turbot scuticociliate isolates. *Fish Shellfish Immunol.*, 25(4): 417-424. doi: 10.1016/j.fsi.2008.05.012
- Piazzon, M.C., Wiegertjes, G.F., Leiro, J., Lamas, J. (2011). Turbot resistance to *Philasterides dicentrarchi* is more dependent on humoral than on cellular immune responses. *Fish Shellfish Immunol.*, 30: 1339-1347. doi: 10.1016/j.fsi.2011.02.026
- 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. *Front. Immunol.*, 7:637. doi: 10.3389/fimmu.2016.00637
- Picchietti, S., Nuñez-Ortiz, N., Stocchi, V., Randelli, E., Buonocore, F., Guerra, L., Scapigliati, G. (2017). Evolution of lymphocytes. Immunoglobulin T of the teleost sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Quantitation of gene expressing and immunoreactive cells. *Fish Shellfish Immunol.*, 63: 40-52. doi: 10.1016/j.fsi.2017.02.002
- Raida, M.K., Buchmann, K. (2007). Temperature-dependent expression of immune-relevant genes in rainbow trout following *Yersinia ruckeri* vaccination. *Dis. Aquat. Organ.*, 77: 41-52. doi: 10.3354/dao01808
- Raida, M.K., Buchmann, K. (2008). Bath vaccination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) against *Yersinia ruckeri*: Effects of temperature on protection and gene expression. *Vaccine*, 26: 1050-1062. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.12.029
- Roberts R.J. (1975). Melanin-containing cells of the teleost fish and their relation to disease. En: *The Pathology of Fishes*. W.E. Ribelin y G. Migaki (eds). pp. 399– 428. University of Wisconsin Press, Madison, WI.
- Salinas, I., Zhang, Y.A., Sunyer, J.O. (2011). Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Dev. Comp. Immunol.*, 35(12): 1346-1365. doi: 10.1016/j.dci.2011.11.009

- Saunders, H.L., Oko, A.L., Scott, A.N., Fan, C.W., Magor, B.G. (2010). The cellular context of AID expressing cells in fish lymphoid tissues. *Dev. Comp. Immunol.*, 34: 669-676. doi: 10.1016/j.dci.2010.01.013
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.*, 3: 1101-1108. doi: 10.1038/nprot.2008.73
- Stavnezer, J., Amemiya, C.T. (2004). Evolution of isotype switching. *Semin. Immunol.*, 16: 257-275. doi: 10.1016/j.smim.2004.08.005
- Steinel, N.C., Bolnick, D.I. (2017). Melanomacrophage centers as a histological indicator of immune function in fish and other poikilotherms. *Front. Immunol.*, 8: 827. doi: 10.3389/fimmu.2017.00827
- Stosik, M.P., Tokarz-Deptuła, B., Deptuła, W. (2018). Specific humoral immunity in *Osteichthyes*. *Cent. Eur. J. Immunol.* 43(3): 335-340. doi: 10.5114/ceji.2018.80054
- Sunyer, J.O. (2012). Evolutionary and functional relationships of B cells from fish and mammals: insights into their novel roles in phagocytosis and presentation of particulate antigen. *Infect. Disord. Drug Targets*, 12: 200-212. doi: 10.2174/187152612800564419

- Sunyer, J.O. (2013). Fishing for mammalian paradigms in the teleost immune system. *Nat. Immunol.*, 14(4): 320-326. doi: 10.1038/ni.2549
- Takizawa, F., Magadan, S., Parra, D., Xu, Z., Korytář, T., Boudinot, P., Sunyer, J.O. (2016). Novel teleost CD4-bearing cell populations provide insights into the evolutionary origins and primordial roles of CD4⁺ lymphocytes and CD4⁺ macrophages *J Immunol.*, 196(11): 4522–4535. doi: 10.4049/jimmunol.1600222
- Tang, X., Du, Y., Sheng, X., Xing, J., Zhan, W. (2018). Molecular cloning and expression analyses of immunoglobulin tau heavy chain (IgT) in turbot, *Scophthalmus maximus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 203: 1-12. doi: 10.1016/j.vetimm.2018.07.011
- Van Muiswinkel, W.B., Lamers, C.H.J., Rombout, J.H.W.M. (1991). Structural and functional aspects of the spleen in bony fish. *Res. Immunol.*, 142: 362-366. doi: 10.1016/0923-2494(91)90093-X
- Venkatesh, B., Lee, A.P., Ravi, V., Maurya, A.K., Lian, M.M., Swann, J.B., Ohta, Y., Flajnik, M.F., Sutoh, Y., Kasahara, M., Hoon, S., Gangu, V., Roy, S.W., Irimia, M., Korzh, V., Kondrychyn, I., Lim, Z.W., Tay, B.H., Tohari, S., Kong, K.W., Ho, S., Lorente-Galdos, B., Quilez, J., Marques-Bonet, T., Raney, B.J., Ingham, P.W., Tay, A., Hillier, L.W., Minx, P., Boehm, T., Wilson, R.K., Brenner, S., Warren, W.C. (2014). Elephant shark genome provides unique insights into

- gnathostome evolution. *Nature*, 505: 174-179. doi: 10.1038/nature12826
- Victoria, G.D., Nussenzweig, M.C. (2012). Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.*, 30: 429-457. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075032
- Vigliano, F.A., Bermúdez, R., Quiroga, M.I., Nieto, J.M. (2006). Evidence for melano-macrophage centres of teleost as evolutionary precursors of germinal centres of higher vertebrates: An immunohistochemical study. *Fish Shellfish Immunol.*, 21: 467-471. doi: 10.1016/j.fsi.2005.12.012
- Wakae, K., Magor, B.G., Saunders, H., Nagaoka, H., Kawamura, A., Kinoshita, K., Honjo, T., Muramatsu, M. (2006). Evolution of class switch recombination function in fish activation-induced cytidine deaminase, AID. *Int. Immunol.*, 18: 41-47. doi: 10.1093/intimm/dxh347
- Xing, J., Li, P., Tang, X., Zhan, W. (2018). Recombinant Hsp33 and OmpC protein can serve as promising divalent vaccine with protection against *Vibrio anguillarum* and *Edwardsiella tarda* in flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Shellfish Immunol.*, 74: 341-348. doi: 10.1016/j.fsi.2017.12.055
- Xu, D.H., Moreira, G.S.A., Shoemaker, C.A., Zhang, D., Beck, B.H. (2017). Expression of immune genes in systemic and mucosal immune tissues of channel catfish vaccinated with live theronts

- of *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish Shellfish Immunol.*, 66: 540-547. doi: 10.1016/j.fsi.2017.05.051
- Yang, S., Tang, X., Sheng, X., Xing, J., Zhan, W. (2017). Development of monoclonal antibodies against IgM of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) and analysis of phagocytosis of fluorescence microspheres by mIgM+ lymphocytes. *Fish Shellfish Immunol.*, 66: 280-288. doi: 10.1016/j.fsi.2017.05.019
- Yang, S., Tang, X., Sheng, X., Xing, J., Zhan, W. (2018). Development of monoclonal antibodies against IgM of sea bass (*Lateolabrax japonicus*) and analysis of phagocytosis by mIgM+ lymphocytes. *Fish Shellfish Immunol.*, 78: 372-382. doi: 10.1016/j.fsi.2018.04.042
- Yu, Y.Y., Kong W., Yin, Y.X., Dong, F., Huang, Z.Y., Yin, G.M., Dong, S., Salinas, I., Zhang, Y.A., Xu, Z. (2018). Mucosal immunoglobulins protect the olfactory organ of teleost fish against parasitic infection. *PLoS Pathog.*, 14(11): e1007251. doi: 10.1371/journal.ppat.1007251
- Zapata, A.G., Cooper, E.L. (1990), *The immune system: Comparative histophysiology*. John Wiley and Sons: Chichester. pp. 335. *Cell Biochem. Funct.*, 9: 294-294. doi:10.1002/cbf.290090414
- Zapata, A., Chiba, A., Varas, A. (1996). Cells and tissues of the immune system of fish. En: *The fish immune system: Organism*

pathogen and environment. G Iwama y T Nakanishi (eds). Academic Press. New York. pp. 1-62.

- Zhang, Y.A., 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. *Nat Immunol.*, 11(9): 827-835. doi: 10.1038/ni.1913
- Zou, J., Secombes, C.J. (2016). The function of fish cytokines. *Biology (Basel)*, 24;5(2).pii: E23. doi: 10.3390/biology5020023
- Zwollo, P., Hennessey, E., Moore, C., Marancik, D.P., Wiens, G.D., Epp, L. (2017). A BCWD-resistant line of rainbow trout exhibits higher abundance of IgT⁺ B cells and heavy chain tau transcripts compared to a susceptible line following challenge with *Flavobacterium psychrophilum*. *Dev. Comp. Immunol.*, 74. 190-199. doi: 10.1016/j.dci.2017.04.019



CAPÍTULO III

**RECEPTORES DE MANOSA TIPO C-1 DEL
RODABALLO. MODULACIÓN DE LA
EXPRESIÓN DURANTE LA VACUNACIÓN**



Receptores de manosa tipo C-1 del rodaballo. Modulación de la expresión durante la vacunación

1. Introducción

El receptor de manosa tipo C-1 (MRC1), también denominado receptor de manosa de macrófagos (MMR1) o CD206, forma parte de una familia de receptores que incluye DEC205 (CD205), MRC2 (Endo180, CD280) y el receptor de la fosfolipasa A₂ (PLA₂R); todos ellos con una estructura básica similar y con importantes funciones en la respuesta inmunitaria (Weiss et al., 1998). MMR1 fue identificado por primera vez en macrófagos alveolares de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) como una proteína de 175 kDa (Wileman *et al.*, 1986) y posteriormente se ha observado que se expresa en determinadas poblaciones de macrófagos, como los que se encuentran en órganos linfoides secundarios asociados a los folículos de células B, en células dendríticas inflamatorias, así como en ciertos endotelios y otros tipos celulares (Martínez-Pomares, 2012). Este receptor está formado por un dominio rico en cisteína (CR), un dominio de fibronectina (FNII), varios dominios de lectina de tipo C (CTLD), un dominio transmembrana y una cola citoplasmática, relevante para la inducción de la endocitosis (Fig. 1). El dominio CR une polisacáridos sulfatados, mientras que el FNII es capaz de unir varios tipos de colágeno. Los CTLDs se unen a carbohidratos acabados en fucosa, manosa o N-acetil glucosamina (Martínez-Pomares, 2012; Taylor *et al.*, 2005).

Esta molécula está presente como una glicoproteína integral de membrana y como una forma soluble producida por una escisión proteolítica en la membrana, por lo que carece de la cola citoplasmática (Martínez-Pomares *et al.*, 1998). Este receptor participa en procesos de endocitosis, transportando su contenido a los lisosomas para degradarlo. MRC1 reconoce los polisacáridos de superficie de diversos patógenos, entre los cuales se pueden mencionar el virus del dengue (Lo *et al.*, 2016), el virus de la inmunodeficiencia humana adquirida (VIH) (Nguyen y Hildreth, 2003), *Schistoma mansoni* (Klaver *et al.*, 2008), *Streptococcus pneumonia* (Macedo-Ramos *et al.*, 2014) o *Trichinella spiralis* (Gruden-Movsesijan y Milosavljevic, 2006). La capacidad de unirse a diversas moléculas presentes en patógenos ha sido empleada tanto en los tratamientos con quimioterápicos (Asthana *et al.*, 2015) como en el diseño racional de vacunas (Martínez-Pomares, 2012). El MRC1 parece jugar un papel importante en la internalización y en promover la presentación de antígenos (Burgdorf *et al.*, 2006). La unión a este receptor lleva a un procesado y a una presentación del antígeno rápida y eficiente, facilitando la entrada del mismo en vesículas intracelulares con componentes clave en el procesado del mismo, lo cual lleva a un aumento de las respuestas mediadas por células T (CD4 y CD8) (Keler *et al.*, 2004; Martínez-Pomares, 2012).

El receptor de manosa ha sido identificado en varias especies de peces, tales como en la carpa de Wuchang (*Megalobrama*

amblycephala) (Liu *et al.*, 2014), la carpa china (*Ctenopharyngodon idella*) (Wang *et al.*, 2014), corvina japonesa (*Larimichthys crocea*) (Dong *et al.*, 2016) o pez cebra (*Danio rerio*) (Zheng *et al.*, 2015). La mayor expresión de este receptor se ha observado en órganos linfoides como el riñón o el bazo y suele verse incrementada tras la infección experimental con bacterias (Wang *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2018). La distribución de células Mrc1 positivas ha sido descrita recientemente en la carpa de Wuchang durante el desarrollo embrionario (Wu *et al.*, 2018), observándose células Mrc1 positivas alrededor de vasos sanguíneos del riñón, alrededor del glomérulo y túbulos renales o dispersas en el parénquima del bazo, entre otros órganos (Wu *et al.*, 2018).

Los estudios realizados en mamíferos indican que el MRC1 facilita la captura y presentación de antígenos de forma eficiente; sin embargo, se desconoce si este receptor juega algún papel durante la inmunización en peces. En este estudio, hemos secuenciado dos genes parálogos del receptor de manosa de rodaballo y hemos comprobado la capacidad de modular la expresión del receptor de manosa por una vacuna contra *Philasterides dicentrarchi* previamente desarrollada en nuestro laboratorio. Además, desarrollamos un anticuerpo para identificar las células Mrc1 positivas en varios órganos relacionados con el sistema inmunitario, así como la dinámica celular durante la vacunación.

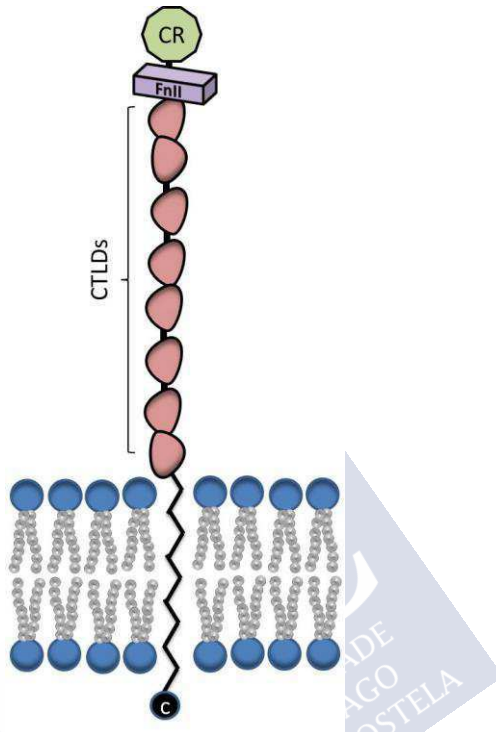


Fig. 1. Organización de los dominios del receptor de manosa. CR: dominio rico en cisteína; FNII: dominio de tipo fibronectina; CTLDs dominios de lectina tipo C; dominio transmembrana; C: dominio citoplasmático C-terminal.

2. Material y métodos

2.1. Animales de experimentación

Los rodaballos, *Scophthalmus maximus*, de aproximadamente 60 g de peso, se obtuvieron de una piscifactoría local y se transfirieron al acuario de la Universidad de Santiago de Compostela, donde fueron aclimatados en tanques de 250 l en agua marina en recirculación a 17 °C, alimentándose diariamente con piensos comerciales. Todos los protocolos experimentales realizados en el presente estudio siguieron

la legislación europea (Directiva 2010/63/UE) y los requisitos legislativos españoles relacionados con el uso de animales para experimentación (RD 53/2013) y fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Santiago de Compostela. Los peces se anestesiaron por inmersión en una disolución 100 mg/l tricaina metano sulfonato (MS-222) (Sigma-Aldrich) en agua de mar. La eutanasia se llevó a cabo por decapitación.

2.2. Vacunación

La vacuna se elaboró según lo descrito por Lamas *et al.* (2008), con ligeras modificaciones. En resumen, cuatro grupos de peces (72 peces por grupo) se inyectaron intraperitonealmente con uno de los siguientes tratamientos: 0,1 ml de tampón fosfato salino (PBS), antígeno entero de *P. dicentrarchi* (10^6 ciliados ml^{-1}) inactivado con formalina al 0,1% y PBS (10^6 ciliados/ml), adyuvante (Montanide ISA 763 A VG; Seppic) y PBS (50:50) o antígeno conjuntamente con adyuvante (50:50). Después de 30 días, se les administró una dosis de refuerzo. Los peces se muestrearon a 6 h, 3 d, y 7 d, así como a 3 d, 7 días y 30 días después de la revacunación.

2.3. Toma de muestras

Después de extraer sangre, los peces se perfundieron intracardiamente con solución de Ringer (1,7% NaCl, 0,024% KCl, 0,031% CaCl_2 , 0,044% MgCl_2 , 0,113% Na_2SO_4 , y 0,049% NaCO_3H ,

pH 7,4) que contenía 0,1% de procaína, durante aproximadamente 5 minutos. La mitad de los órganos se utilizaron para inmunohistoquímica y la otra mitad para analizar la expresión génica. Medio bazo y medio riñón anterior se fijaron por inmersión con paraformaldehído al 4% en PBS 0,1 M durante toda la noche a 4 °C. Todos los órganos se lavaron dos veces en PBS durante 24 h a 4 °C, se crioprotegieron con sacarosa al 30% en PBS, se embebieron en compuesto OCT (Tissue Tek) y se congelaron en un baño de isopentano enfriado por nitrógeno líquido. Las secciones, de 4 µm de grosor, se obtuvieron en un criostato y se colocaron sobre portaobjetos StarFrost (Waldemar Knittel), tras lo que se guardaron a -20 °C. El medio bazo y el medio riñón anterior restantes se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron en un congelador de -80 °C para su posterior procesamiento para determinar la expresión génica.

2.4. Producción del anticuerpo Anti-Mrc1-1 y validación por Western blot

El anticuerpo anti-Mrc1-1 de rodaballo fue producido por Genosphere Biotechnologies (Clamart, Francia) inyectando el péptido sintético HLNWGNRNERNIMI conjugado con KLH en conejo. El suero obtenido fue testado por ELISA frente al péptido (Tabla 1).

Dilución de anti-Mrc1-1	Conejo	
	Preimmune	Inmunizado
1:1000	0,101	1,62
1:10000	0,075	0,89
1:100000	0,041	0,44

Tabla 1: Reconocimiento del péptido sintético con anti-Mrc1-1 por medio de ELISA llevado a cabo por Genosphere technologies.

Para la validación del anticuerpo, las muestras se diluyeron en tampón Laemmli (Bio-Rad) en condiciones no reductoras o reductoras. La reducción de muestras se llevó a cabo en tampón Laemmli (Bio-rad) con 0,02 M de ditioneitol (Sigma-Aldrich), hirviéndolas en agua destilada durante 5 min. Ambas muestras se corrieron en un gel Mini-PROTEAN® TGX™ de 4–20% (Bio-Rad). Las proteínas se transfirieron con una célula de transferencia semiseca Trans-Blot SD (Bio-Rad), con tampón de transferencia (Tris 48 mM, glicina 29 mM, SDS al 0,037% y metanol al 10%, pH 9,2) a 15 V durante 40 minutos en una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm de tamaño de poro (Bio-Rad). La membrana se bloqueó con Tampón Tris Salino (TBS) (50 mM Tris, 0,15 M NaCl, pH 7,4) con 0,2% de Tween 20 (TBS-T₁) con leche desnatada al 5% y se incubó a 4 °C durante la noche con el anticuerpo anti-Mrc1-1 diluido 1:2000 en TBS-T₁ con leche desnatada al 1%. El anticuerpo anti-Mrc1-1 se preincubó con KLH (1 mg/ml). Después de 3 lavados de 15 minutos con TBS con

0,05% de Tween 20 (TBS-T₂) y dos lavados de 10 minutos con TBS, la membrana se incubó con una dilución de 1:2000 de cabra anticonejo-HRP (Dako) en TBS-T₁ durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras 3 lavados de 15 minutos con TBS-T₂ y 2 lavados de 10 minutos con TBS, las membranas se visualizaron con 0,003% de H₂O₂ y 0,06% de tetrahidrocloreuro de 3,3'-diaminobencidina con NiCl₂ al 0,03% (DAB/NiCl₂) (Sigma-Aldrich). Las membranas se fotografiaron con una cámara Panasonic DMC-TZ4.

2.5. Inmunohistoquímica

La recuperación antigénica se realizó calentando los portaobjetos en tampón citrato 0,01 M (pH 6,0) durante 30 min en un baño de 95 °C. Para desactivar la actividad peroxidasa endógena, las secciones se incubaron con una solución de bloqueo de peroxidasa (Dako) durante 45 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego, para reducir el fondo, los portaobjetos se bloquearon con TBS que contenía suero normal de cabra (NGS) (Sigma-Aldrich) al 10% y BSA (Sigma-Aldrich) al 1 % durante 1 hora a temperatura ambiente. Las secciones se incubaron durante la noche a 4 °C con el anticuerpo policlonal anti-MRC1-1, diluido 1:4000 en diluyente de anticuerpos (Dako). Posteriormente, las muestras se incubaron con el anticuerpo de cabra anticonejo-HRP) (Dako) en TBS con 15% de suero normal de cabra y 1% de BSA durante 1 h a temperatura ambiente. La reacción de peroxidasa se llevó a cabo con tabletas SIGMAFAST™

3,3'-diaminobencidina (Sigma-Aldrich). Las secciones se tiñeron con hematoxilina de Mayer, se deshidrataron y se montaron en medio DPX (Sigma-Aldrich). Todos los pasos de incubación se llevaron a cabo en una cámara húmeda y después de cada una de las incubaciones con el anticuerpo primario o secundario, las secciones se lavaron tres veces con TBS-T₂ y otras tres con TBS durante 5 min. Los controles negativos se llevaron a cabo sustituyendo el anticuerpo anti-Mrc1-1 por suero preinmune de conejo (1:4000; Genosphere Biotechnologies) o preincubando el anti-Mrc1-1 con KLH (Sigma-Aldrich) a 1 o 10 mg/ml.

2.6. Amplificación rápida de los extremos del ADNc (RACE)

En base a la secuencia de los receptores de manosa de rodaballo amablemente cedidos por el profesor Paulino Martínez, del área de Genética de la Universidad de Santiago de Compostela, diseñamos cebadores específicos (Tabla 2) para la amplificación rápida de los extremos 5' y 3' de los ADNc de acuerdo con el manual de usuario del kit SMARTer[®] RACE 5'/3' (Laboratorios Clontech). El método RACE se utilizó para completar la secuencia nucleotídica de dos receptores de manosa (*mrc1-1* y *mrc1-2*). Los plásmidos positivos detectados por electroforesis se enviaron a Nzytech (Portugal) para su secuenciación.

Nombre del cebador	Secuencia del cebador (5'-3')	Longitud del fragmento	Reacción RACE
MRC1-1R	GGGACAAAAACCCCIACCTCCTCACA	794bp	5'RACE
MRC1-1F	CAACTGGAAAACGGGAATGCCAAAG	893bp	3'RACE
MRC1-2R1	CAGGTGTTGAGTGTGCTCGT	810 bp	5'RACE
MRC1-2R2	TCCAACCGTCTGCACACTTA	510bp	5'RACE
MPC1-2R3	GTTTCTCATCACACGAGCGA	1154bp	5'RACE
MRC1-2R4	CCCCAGGCACTTTTGGATGCGACAG	288 bp	5'RACE
MRC1-2F1	ACGAGCACACTCAACACCTG	119 bp	3'RACE
MRC1-2F2	GGACAACCTGGGAAGAATCA	1118 bp	3'RACE
MRC1-2F3	ACCCAAGATGGGACTTGGCAGTCAG	824 bp	3'RACE

Tabla 2. Cebadores específicos para las reacciones de RACE 5' y 3'

2.7. PCR cuantitativa (con transcriptasa inversa) (RT-qPCR)

El ARN total del bazo y del riñón anterior se extrajo y el ADNc se sintetizó, con ligeras modificaciones, según lo descrito anteriormente (Fontenla *et al.*, 2016). Resumiendo, se empleó el método del TRI Reagent® (Sigma-Aldrich) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN resultante se secó, se disolvió en agua libre de ARNasas y se cuantificó en un espectrofotómetro Nano Drop ND-1000 (NanoDrop Technologies). El ARN total se trató con ADNase I (Thermo Scientific) para eliminar la posible contaminación con ADN genómico. La síntesis del ADNc se realizó con 20 ng/μl de hexanucleótidos aleatorios (Nzytech), 0,5 mM de cada nucleósido trifosfato (dNTP) (Nzytech), 20 U de inhibidor de ribonucleasas (Nzytech), 200 U de transcriptasa reversa (*M-MuLV Reverse Transcriptase*) (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. 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 3). Las mezclas se incubaron durante 5 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de incubación (10 s a 95 °C y 30 s a 60 °C) y un ciclo de disociación consistente en 15 s a 95 °C, 15 s a 55 °C y 15 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). El tamaño y la especificidad de los productos de PCR se comprobaron en un gel de agarosa al 2%. La expresión normalizada de los genes se determinó por el método CT comparativo (Schmittgen y Livak, 2008) mediante software, de acuerdo a las guías de la mínima información para la publicación de experimentos de RT-qPCR (Bustin *et al.*, 2009; Bustin y Wittwer, 2017). Para cada órgano, se comprobaron los genes de la beta-actina, factor de elongación 1-alfa y *gadph* para su uso como gen control constitutivo, identificando el factor de elongación 1-alfa como el más estable en las condiciones del experimento y siendo este el empleado en todas las RT-qPCR.

Genes	Cebadores	Secuencia (5'→3')
Receptor de manosa 1-1 (<i>mrc1-1</i>)	QMR1F (directo)	TGATACAGCACCCACTGAGC
Receptor de manosa 1-1 (<i>mrc1-1</i>)	QMR1R (reverso)	ACCACTGAGCTGAGGAAGGA
Receptor de manosa 1-2 (<i>mrc1-2</i>)	QMR2F (directo)	GGACTGCAAAGATGGGAAGA
Receptor de manosa 1-2 (<i>mrc1-2</i>)	QMR2R (reverso)	CAGGTGTTGAGTGTGCTCGT
Elongation factor 1-alpha (<i>eef1a1</i>)	EF-1α (directo)	GGAGGCCAGCTCAAAGATGG
Elongation factor 1-alpha (<i>eef1a1</i>)	EF-1α (reverso)	ACAGTTCCAATACCGCCGATTT

Tabla 3. Secuencias específicas de cebadores para la qPCR.

2.8. Análisis bioinformático

Las secuencias de los receptores de manosa obtenidos por RACE PCR se ensamblaron a mano y se identificó su marco de lectura abierto. El programa BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) se utilizó para analizar las secuencias de nucleótidos y buscar secuencias de proteínas de otras especies en la base de datos. Se realizaron alineaciones de secuencias múltiples utilizando el programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). La identificación de dominios de proteínas y el análisis funcional de proteínas se realizó utilizando la herramienta InterProScan del Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI) disponible en el siguiente sitio web: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>. Para determinar las propiedades fisicoquímicas de las proteínas a partir de la secuencia de aminoácidos se utilizó la herramienta de bioinformática ProtParam del servidor ExPASy disponible en la siguiente dirección: <https://web.expasy.org/protparam/>. Para predecir la presencia y

ubicación de sitios de escisión de péptidos señal en secuencias de aminoácidos se usó el servidor Signal-3L disponible en: <http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Signal-3L/>. El servidor NetNGlyc se usó para predecir sitios de N-glicosilación (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). Los análisis evolutivos se realizaron con el programa MEGA X (Kumar *et al.*, 2018).

2.9. Análisis estadístico

Los datos se expresan como media \pm la desviación estándar. La significación estadística se determinó mediante análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un test post-hoc de Tukey para la comparación múltiple. Las diferencias se consideraron significativas con $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Estructura de los receptores Mrc1-1 y Mrc1-2 de rodaballo

Hemos identificado dos receptores de manosa en rodaballo a los que hemos denominado Mrc1-1 y Mrc1-2, por su similitud con el receptor de manosa tipo C-1 (MRC1 o CD206) descrito en mamíferos.

El receptor de manosa de rodaballo tipo C 1-1 (*mrc1-1*) contiene una región no traducida de 155 pb en el extremo 5', un marco de lectura abierto de 4311 pb que codifica para 1437 aminoácidos y una región no traducida de 511 pb en el extremo 3' que contiene la señal de poliadenilación y una cola de poli A de 29 pb (Fig. 2). La masa molecular prevista para esta molécula Mrc1-1 es de 162503,48

Da. Seis sitios potenciales de N-glicosilación están presentes en las posiciones 107 (NETL), 790 (NTTE), 800 (NDTQ), 921 (NTTM), 1094 (NDSY) y 1150 (NMTG) (Fig.2).

```

ccttaacttactatagggcagcagtggtatcaacgcagagtagatggtgggtcactatgtca
cataccttagcacactacagacctcttctctcaagactggaacactctcgcaccacctctt
ccaccactgagtgcaagctacacatcaaggataatgttccttgtttaagtttagctgtg
                                M F P C L S L A V
atcctttgtctcctgcaagtcactctgcattactgctgacatagacagtggtccttctcg
I L C L L Q V I C I T A D I D S G S F L
atttcaacgataaccacaacaagtgcatcaaggtggagagcggccacctcggttaacttg
I F N D N H N K C I K V E S A T S V T L
gcccttgtgatctcatgccaacaacagcagtttctgtgggtctccagctcgcgtgtt
A P C D P H A K Q Q Q F R W A S Q S R V
ctcagctctctccctcaagctctgtctgtggggcaacagagataaaagactgggtgaagtc
L S L S L K L C L G A T E I K D W V K V
ctcctcttgaatgtgatgacaacagtgatctccagcattggcagtgcaagaatgagact
L L F E C D D N S D L Q H W Q C K N E T
ctgtttgctcaaaagaccaggacctgcacttaaaactgggaaatcgaaatgagaggaaac
L F G L K D Q D L H L N W G N R N E R N
ataatgatctacaaggctccgggacttggagtcactggaggatatttggtagctcaggt
I M I Y K G S G T W S H W R I F G T R G
gacdtttgtcaaaaggggtatcaagagattttcacaaatagggggcaatgcctttgtgccc
D L C S K G Y Q E I F T I G G N A F G A
ccttgtcaactcccttttaagtttggtagaattggtagctgaatgtacaaaagaggtt
P C Q L P F K F G E N W Y A E C T K E G
cgagtcgatggacagctgtggtgtgccacagagagattacgacattgtgaggaagtgg
R V D G Q L W C A T E R D Y D I V R K W
ggtttttgtcccaccaagcatcctcaggttgggacactgaccagtcactgaggttcag
G F C P T Q A S S G W D T D P V T E V Q
tatcaaaggaatgcacagtcagtggttgacctggcatcaagccaggaagagctccagcag
Y Q R N A Q S V L T W H Q A R K K C Q Q
caaggagctgacctcctcagcatcgtagagctacatgagcagtcatacatttcagggtta
Q G A D L L S I V E L H E Q S Y I S G L
acaaatgcgttgggaacatctctgtggattggactgaattccttggattttgagagtgga
T N A L G T S L W I G L N S L D F E S G
tggcagtgagcaatggaatccatttagatattttaaactgggccccaggtcatccctcg
W Q W S N G N P F R Y L N W A P G H P S
tcagatcctggagatacctgtgcaaccctaaatgttgcaaaagcctcaaatgggaaagc
S D P G D T C A T L N V A K A S K W E S
agcgcttgcaaaagaaacttggttacatttgcgcaaaagaaactccaagagctctgcc
S A C T K K L G Y I C R K G N S K S L P
ccaccaccaagcaagatcagccagctactgtcccagtcactgggttcctttagcaagt
P P P S K D Q P S Y C P S H W V P Y A S
aaactgttactacctggagaggaatacaaaagatgtggaggatgcttttgggttcgtgccac
N C Y Y L E R N T K M W R D A L V A C H
aaagggaggagatttggccagcactcaatagaagagcagagtttcatcatttct
K E G L G A S I L N I E E Q S F I I S
caactctggatacttgccaacagatgtgctctggattggcttgaatgatcagagaaaccag
Q S G Y L P T D V L W I G L N D Q R N Q
atgctgtttgaatgggtccgatcactcccatttaccagtggtgcaaacgggtgaa
M L F E W S D H S H V T F T Q W Q T G E
    
```

ccatctcatgccaccaatctacaggaagactgtgttctcatcagaggaaggatggggag
 P S H A T N L Q E D C V L I R G K D G R
 tgggcagatcacatgtgtgaaaagacatatgggtatatctgtaagaagagggcctccact
 W A D H M C E K T Y G Y I C K K R A S T Q
 aaacctctgaaggtgttcaagaggaagccaatcctggatgcaagctaggctcgatcagg
 K P S E G V Q E E A N P G C K L G S I R
 tttggttcactactgtttacaatgttggagctgagacaaaaacctttgatgaggaacaacag
 F G S Y C Y N V G A E T K T F D E A T Q
 gcatgctcagtggttggcgtaaacctgatagatgtggctgacagatatgagaatgccttc
 A C S V V G A N L I D V A D R Y E N A F
 ctggctcagtttgggtggtctaagaccagagaagtatttctggatgggtttgtccaacatg
 L V S L V G L R P E K Y F W M G L S N M
 gaagatagaaacacttttctgatggaccaccaaagaaggtcatgttctactcatttcaac
 E D R N T F R W T T K R K V M F T H F N
 gtgggattgccagacagaaaaaaggttgtgttgaccttgacaactggggcttttctgtgga
 V G L P D T R K Q G C V A L T T G A F A G
 ttatggatgttctgactgcagcaataaggagaaatatactgcaagaaacagcagag
 L W D V V S C S N K E K Y I C K K P A E
 ggtgtgctaagagcagccttccaccaccactccggacctgagctgtgcctcaggtgg
 G V L R T T V P P T T P D L S C A S G W
 acctctctgacaaaaaggaactttgtctacaagctttacaaaaaacaaaagactcttaag
 T P A D K R N V C Y K L Y K K Q K D L K
 aagacttggcatgaagcacagagacttttgaaggccattgttggggacctgatgagcatc
 K T W H E A Q D F C K A I G G D L M S I
 cacagttcacaggtcctaagcaatgctccgtttctatgctctgagtgagcaggttggc
 H S S Q D L S N A P F H A S D G A W I G
 ttcagctccctggataccaaccaaggttttctgtgactgatgggtctgtaacgacttt
 F S S L D T N Q G F V W T D G S A N D F
 gagaactggggctatgagaaccaaactacaatgacaattgacaattgtgcagaagtc
 E N W G Y G E P N N Y N D N E H C A E V
 cagttctactatggacggcactggaacgatcggcactgtgagggcatgtaatgactggatc
 Q F Y Y G R H W N D R H C E A C N D W I
 tgcagatacgcaaaaggtgtgactccaaaacctgagcctgcatatgctgcaacagtatc
 C Q I R K G V T P K P E P A I V A T V Y
 aaaccacagaagatggctggtcatatacaatgacacacagtatttcatcaacactgac
N T T E D G W L I Y N D T Q Y F I N T D
 accctttccatgggaagctgccagagcctactgcaaaaaaacctttggggaacttgggtc
 T L S M E A R A Y C K K N F G E L V V
 atcacaggggagagtgagaggaagttcctttggaaacagctagccaaggcacagaagga
 I T G E S E R K F L W K Q L A K G T E G
 cagtactacattggcagtgatgaatttggataagtcatttagctggctggatggcagc
 Q Y Y I G M A V N L D K S F S W L D G T
 cctgtaacttacactgcatgggaacaaaatgagcccaactttgctaacaatgatgaaaac
 P V T Y T A W E Q N E P N F A N N D E N
 tgtgtgactatatacaagaacatgggttactggaatgatattaactgtggatggagta
 C V T I Y K N M G Y W N D I N C G M E L
 ccctctatgatgaaaaagaagcagtagttttatcaatacaacaatggccccaccactggt
 P S I C K R S S S F I N T T M A P T T V
 cccaaggggggtgtgcaccagagtggtatctttccaaggaagtgctacaaatttgtt
 P K G C A P E W L S F Q G K C Y K F L
 gtggggaatgacaataagaactggcaggaagccaggacttactgcataaacaggaggga
 V G N D N K N W Q E A R T Y C I N Q G G
 aaactggtttctatcgtcaatgacagagagcaagctttcctaacaacacagatgctgaga
 N L V S I V N D R E Q A F L T T C Q M L R
 tacaatgcagatttttggattggcatgaatgatgtcaactgggagatgcacttctgatgg
 Y N A D F W I G M N D V N W E M H F V W

Fig. 2. Secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del Mrc1-1 de rodaballo. Los sitios potenciales de glicosilación están subrayados.

El receptor *mrc1-2* contiene una región no traducida de 54 pb en el extremo 5', un marco de lectura abierto de 4290 pb que codifica para 1430 aminoácidos y una región no traducida de 479 pb en el extremo 3' que contiene la señal de poliadenilación (Fig. 3). La masa molecular prevista para esta molécula Mrc1-2 es de 162395,38 Da. Nueve sitios potenciales de N-glicosilación están presentes en las posiciones 106 (NNTL), 773 (NATA), 780 (NTTS), 911 (NTTA), 1035 (NPSL), 1049 (NDTK), 1080 (NDSI), 1089 (NLTW) y 1181 (NQTM) (Fig. 3).

```

aacttactaatatacgggcagcagtggtatcaacgcagagtacatgggggggcaatgtct
                                     M S
gctgctgtgagacttatcagaggaagaatgctgacccttaggataactctagcagccttt
A A V R L I R G R M L T L R I T L A A F
ttactcttcatacctaacatctcaatgttcaacagcaaatgatgccaattctcactcacc
L L F I L T S Q C S T A N D A Q F S L T
aacaagggccacggggtttgttggctgaaaaaattcaaccgctgccttgacatccgctgg
N K A T G F C L L K K F N R C L D I R W
acgacgggtaatcggttttgcgctgctgcacataaaagtgctggggcgagggcaaaa
T T G N R L F A V A S K K C L G A Q G K
actgtggggagtgaagtgaacctctacgactgtgatgacaagactgacctccagaagtgg
T V G S E V N L Y D C D D K T D L Q K W
gaatgcaggaacaacagctgctgcacctcaaggcaagagctctacattggagtgcaaa
E C R N N T L L A L K G K E L Y I G V K
gctgatgaatcaattgctctcaccaaaacggttgggcaaaataaccacctcacaatcact
A D E S I A L T K T V G P N N H L T I T
gggacaaccagcggtgcttgcaagaacatacagagaattgtacaccattggaggaaat
G T T S G A C T R T Y R E L Y T I G G N
tcatttggtaagatctgcacatttcccttctctacaagaccgctggtttggagattgc
S F G K I C T F P F F Y K D R W F G D C
accacgttcgactcctcaciaaaagcgtctctggtgtgcagtgagacaaaaatgaaac
T T F Y Q S S Q K R L W C A V E P Q A E V K
gaactgtggggatactgcccgactacttccagagatcactggacgaaatacctcgtaaca
E L W G Y C P T T S R D H W T K Y L V T
ggaacatattacaaatcaacacacagtcagctctgacatggcctcaggccgaagtgcg
G T Y Y Q S I N T Q S A L T W P Q A E V S
tgcaaacagcagggcgccaccctggtcagtatctacgaaccaaatgagcaggttttcac
C K Q Q G A T L V S I Y E P N E Q A F I

```

cgacactactagggaggggaaataaaactttggattggagtggttctggaccagaa
 A A L L G E G K Y K L W I G V V L D P E
 catggctggcagtgagtaatgggaagcctttccggttacttgagatggagtggaaac
 H G W Q W S N G K P F R Y L R W S T G N
 ccaacttctaataccaggacacaactgtgcatttcttgacactgccgagcagcattcttg
 P L P N P G H N C A F L D T A E Q H S W
 caaagtctctcgtcatgaagaactgggctacatctgctacaagacatggtcacacca
 Q S S S C M K K L G Y I C Y K D M V T P
 actccaactaactgagcaagggttttggttcaagcccatggattccctacaatggccac
 T P T L T E Q G F C S S P W I P Y N G H
 tgctccacctgcagcgttctcttcaaacatggtctaagctcagatagagtccgcaaa
 C F H L Q R S L Q T W S N A Q I E C R K
 gagcgaggagacctagtgagcattcgcaatgtggaggaccaagcctttgtcatctctcaa
 E R G D L V S I R N V E D Q S F V I S Q
 cttggatacgcacatcagtgatgagcctttggattggactaaatgacaggaggacagagggg
 L G Y A S S D E L W I G L N D R T E G
 ttttgcagtggagtactattctgctgctcagcttaccagctgggagratgaggaaacct
 F F D W S D Y S A V S F T S W E Y G K P
 gctgtgtccactgatggagaagactgttctcatcaagggggagaaggggaaactgggcg
 A V S T D G E D C V L I K G E K G N W A
 gatcgctcgtgatgagaaacacggcctttatctgtatgaagcagagtgacactgcaacgc
 D R S C D E K H G F I C M K Q S D T E R
 actggagaagaagtggatctggacataggtcgtcaaagcgggttggaaaagacatggtcc
 T G E E V D L D I G C K A G W K R H G S
 tactgtactttgtaggaagtgagacaaagacttttggatgaagccaaacagaaaacat
 Y C Y F V G S E T K T F D E A K D E C K
 agctcagactcctacttagctgatgttcaaatggggtggacaacgccttccctgtcagc
 S S D S Y L A D V S N G V D N A F L V S
 ttgggtgggttgagaccagaaaataacttctggttagggctgtcaaacagaaaacat
 L V G L R P E K Y F W L G L S N Q K N I
 gatgaatttgtgtggaccaaacacagactcagtgagggtcactcactggaacactgagatg
 D E F V W T N T D S V R F T H W N T E M
 ccaggttacagagaggttgtgtggtgcatgacaactggggttttggccggactttgggat
 P G Y R E G C V A M T T G V L A G L W D
 ctgctgcctcgcaccaaccaggagaaatacatctgcaaacacctggcagagggggcagtt
 L L P C T N Q E K Y I C K H L A E G A V
 ttaacctcccaccaccgactcaaatcctcctaagtgtgcagacgggtggactcgtaca
 L T V P P P T Q I P P K C A D G W T R S
 ggaacaagaacatctgctctaagtttttacagggcccggtcagatgagaagacctggg
 G T R N I C S K F F T G P R S D E K T W
 tatgaggcaagggtactctcagggcattggaggagatctgctcagcatccacagctct
 Y E A R D Y C R A I G G D L L S I H S S
 gctgtactattagtgaggcgttatggaaaagcctggattggacttcatgttctctgatcca
 A V L L V G R Y G K A W I G L H V P D P
 agtactggttatgcatggagcgtgatggatccccattaaacttccagcactggcaggaagga
 S T G Y A W N D G S P L N F Q H W T Q E G
 gagccaaacaatcttaacaatgcggaatcttgtgctgaattcaaaataaatagctgggat
 E P N N L N N A E S C A E F K I N S W D
 gaatccgggtcttggaaacgatggaactgtgaaacttacaatgactggctgtgtcagatc
 E S G S W N D V N C E T Y N D W L C Q I
 cgtgcaggagtgtatccaaaactccctccaaatgccacagcagtggtgactacaataccact
 R A G V I P K L P P N A T A V D Y N T T
 tcagatggttggcttgagtggagaggaatcagtattacattaacagagtggtcaatgcc
S D G W E W R G N Q Y Y I N R V A M P
 atggaagatgctcgtaatttctgtcagaagaagcatggtgacttggatctatcagcagt
 M E D A R N F C Q K K H G D L V S I S S

aaagatgaaaataacttcttatggaacagatttctagaagctatgggcaatattatata
 K D E N N F L W K Q I S R S Y G Q Y Y I
 ggtttgtctgtggatcttgcgggtcattttggggatggatggtacttcagtgggactg
 G L S V D L D G S F W W M D G T T S V G L
 caaagatgggaagaaaatcaaccgaatacaaatcctttgatgagaactgtgttactatg
 Q R W E E N Q P N T N T F D E N C V T M
 acttattatattgggcttctggcgcacacgtaactgtggccaagataaccagccctttgt
 T Y Y M G F W R T R N C G Q D A N Q P F T
 aaacgagcacactcaacacctgccaacaccactgcagccccacagttccccctaaaggt
 K R A H S T P A N T T A A P T V P P K G
 ggctgccactcaagtggaagcaatttgactcaaagtgttacagtatcaacagtgctccgg
 G C P L K W K Q F D S K C Y S I N S V R
 aggacaacctggaagaatcaaggagtcagtgacattaccattggaggaaatttagtctca
 R T T W E E S R S Q C I T I G G N L V S
 gttccgacaagacgtgtgcaagcatttctaaccaccttactggcagcagtaggaacagac
 V P T R R V Q A F L T T L A A V G T D
 gtgtggataggttgaatagataaaacaggatgggtttttactgatgagaaagcca
 V W I G L N S I K Q D G F Y W T D G K P
 aggcgatataccaactggggatattctaacaacagcgtattctcgggaacttttatcaa
 R R Y T N W G Y S K Q Q R I P G N F Y I
 agatgaaatgaggaagctgtttgtgatgaacagcaatccttcccttggcactgtgtaa
 R W N E E D C V V M N S N P S L G T G K
 tggttgataggtccttgaatgacaccaaggatgtgtctgtcatcgaaatccttgacca
 W L I R S C N D T K G F V C H R N L D P
 aattccgtagctcaaccaacaatagttcacaattactacgtaactctaggaatgacagc
 N S V A Q P T I V H N Y Y V T L G N D S
 atcaaggtcttgactcaaaatctgacctgggacaatgccaagaacactgtgaagtgat
 I K A L T Q N L T W D N A K K H C E G D
 aaagccaacctgtgagctacgaaatgaatggacacaggcctatgttgagctgtggct
 K A N L V S L R N E W T Q A Y V E L L A
 atgaatctcaaatctccctgtggatggactgaacaagcagcagactgggggtatttt
 M N L K S P L W I G L N K Q Q T G G Y F
 aggtatattgatgctggcagatgaacattgccaattgggctgaaggaacagcagcag
 R Y I D G W Q M N I A N W A E G E P S S
 gacctaccttgctgtacatggatgtggaaggaaaatggaggactgctctctgcaatcag
 D L P C V Y M D V E G K W R T A L C N Q
 accatgaacagtgttgtatgcagctacagatgtgccaccaacagagtaaccactttc
 T M N S V C M Q S T D V P P T E S T T F
 ccaggaatttgcctgatgagacaagttcagagtaccaccagagtttttctgggtgcca
 P G I C P D E T S S E Y H Q S F S W L P
 ttaaggccattgttattgtttatcacggaggaagttgaaaggcaaatgcagctagc
 F K G H C Y L F I T E E V E W A N A A S
 agctgtgtacggcatggcggatcttgactagcatagaagatccttctgagcaacaattc
 S C V R H G G I L T S I E D P S E Q Q F
 ctcagaagcaacttggaaatatttcaaatagccacacatcattctggatcggactgtat
 L R S N L E I F Q N S H T S F W I G L Y
 aaaactcataaaggacatggatgtggttggatagaacagtccttagactacactaactgg
 K T H K G T W M W L D R T V L D Y T N W
 gctgcagatgagcccgatctgactttgaaatatcgcaaccaagatgggacttggcag
 A A D E P D S D F G N I A T Q D G T W Q
 tcaggacacagatggcacgatagaccattcatctgtaaaactcctaaagtgattttccaa
 S G H R W H D R P F I C K T P K V I F Q
 gattcagatattaaacctgaacctcattggaggtcaggatcctcgcagtcgcgccccaca
 D S D I K E P H G G Q D P R S R C R A H T
 acgttgggtgtgtagtgatcattgtcttctgtctctcgtgatagcaattcaagtcctc
 T L V V V V I I A F V S S L I A I Q V F

```

ctctacaagaagtttctcgtctcacaaccctttgaaaatccactataacttcaacagt
L Y K K F P R L I P T F E N P L Y F N S
gaacgatctcagccagatgtagtggacaccaataaactgatagagaatgcagaggaagaa
E R S Q P D V V D T N K L I E N A E E E
atccctgagcctattatagctctgtgattcataaagtaacagaatctagtggggcatata
I P E P I I A L
ccctatagtgtatctcacaatgatgtattacacattgatgcttcatttatgtttttgcta
ttgttggtttttttacaatatacattctatatattgacttatttaacagatgtgactaag
tgtgagtttcagtgagggttggcgatgtctaacctcatggaacagaatttaggctctagga
tgtctcaatgggaatgattagatattttactttttcttttttctctatgactggatgata
gaattgtcatgttatgcttatgccactagatgctgcttcattgcttgtacttgaaaatgtg
caaaaatcatcagcctgtcactgttaaatgaacattaatcttggcaaaaacaataaatgt
tcattttgaggttgttctcatttgatacaatgtctaattaataataataaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
    
```

Fig. 3. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos deducidos de Mrc1-2 de rodaballo. Los sitios de potencial glicosilación están subrayados.

Se identificaron cuatro dominios potenciales (péptido señal, dominios extracelulares, región transmembrana y dominio citoplasmático) en ambas moléculas. La región extracelular está formada por un dominio N-terminal rico en cisteína (CR), uno de fibronectina tipo II (FNII) y ocho dominios de lectina tipo C (CTLD) (Fig. 4). Otros sitios importantes para la regulación de la actividad del receptor de manosa también están presentes en ambas moléculas de rodaballo (Fig. 4): residuos conservados de cisteína y residuos aromáticos F (Phe) y W (Trp), sitios conservados (EPN y WND) de dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRD), sitios de unión a Ca⁺², dos motivos potenciales de endocitosis (F-N-Y y LX) y el residuo ácido conservado “D”.

Scophthalmus maximus MRC1-2	MSAAVRLIRGRMLTLRITLAAFLLFILTSQCSTANDAQFSLTNKATGFLLLK-----
Danio rerio	-----MKI-ITVVVLPVLELSNCFQSGD--SFLLYNVDSNKLTST---LNRL
Takifugu rubripes	-----MLPCLSSAVVLGLLQ-VFWISAAMDTGSFLIFNENHKKIKVESPTSITV
Dicentrarchus labrax	-----MLPCSNLAVVLCLLH-VICITADIDSGSFLIYNENHKKIKAESATSMIV
Scophthalmus maximus MRC1-1	-----MFPCSLAVILCLLQ-VICITADIDSGSFLIFNDNHKKIKVESATSVTL

Latimeria chalumnae -----MM----TGILFALLF--FFQKMSQLDSSVFLIHNKAHDRIVDVKSTSTVLA
 Homo sapiens -----M---RLPPLLVFASVIFPGAVLLLDTRQFLIYNEDHKRIVDAVSPSAVQT
 Mus musculus -----M---RLLLLLAFISVIVPVSQQLLDARQFLIYNEDHKRIVDALSAISVQT
 Alligator mississippiensis -----MP---AVSLLLLLGLVPAALPQDSTSTFLIYNEDHKRIVLAQSSSSVIT
 Columba livia -----M---APALLLLLLLPRGFFLLDTSIFLIYNEDHKRIVLAQSSNSVTT

CR

Scophthalmus maximus MRC1-2 ----FNRCDLIRWTTGNRLFVAVASKKILGAQCKTVGSEVNLVDKDTDLQKWEKRNNT
 Danio rerio ----FNRCDLIRWTTGNRLFVAVASKKILGAQCKTVGSEVNLVDKDTDLQKWEKRNNT
 Takifugu rubripes AQCDPHAKDQQFRWASEYRVLSLKLQLLGAESIKDWVKVILFEDDESSQLQHWKKNNDT
 Dicentrarchus labrax APCDPHAKDQQFRWASEYRVLSLKLQLLGAESIKDWVKVILFEDDESSQLQHWKKNNDT
 Scophthalmus maximus MRC1-1 APCDPHAKDQQFRWASQSRVLSLKLQLLGAESIKDWVKVILFEDDSDQLQHWKKNNET
 Latimeria chalumnae SPCDVNAKAQKFRWISSEKLLMNVALKQLGVSTKDKDWPVTLFNEKEDLQKWEKKNNDT
 Homo sapiens AACNQDAESQKFRWVSESQIMSAVFKLLGVPSKTDWVAITLYADSKSEFQKWEKKNNDT
 Mus musculus ATCNPEAESQKFRWVSDSQIMSAVFKLLGVPSKTDWVAITLYADSKSEYQKWEKKNNDT
 Alligator mississippiensis APCQENESQKFRWVSDVHLSMTLKLGLVPSKDKDWPVITLYADKASELQKWEKRNNT
 Columba livia APCVQENESQKFRWVSDHQLMSIAFKLLGVPSKDKDWPVITLYADKASELQKWEKRNNT

Scophthalmus maximus MRC1-2 LLALKGKELYIG--VKADESIALTKTVPGNHLLITGTTSGAARTRYRELYTIGGNSFGK
 Danio rerio LLGLKNETLFLAVDFRGLPEI--SNKTGIRSKWTHIGTQDSISRFPYEEIYSIDNGHFGFO
 Takifugu rubripes LFLGKENDLHLNWNFNERNIMIKYKGSGLWSRWRTIYGTQDGLSKGFQEIFTTIGGNAPGA
 Dicentrarchus labrax IFGLKQDLDHLNWNFNERNIMIKYKGSGLWSRWRTIYGTQDGLSKGFQEIFTTIGGNAPGA
 Scophthalmus maximus MRC1-1 LFLGKQDLDHLNWNFNERNIMIKYKGSGLWSRWRTIYGTQDGLSKGFQEIFTTIGGNAPGA
 Latimeria chalumnae LFAIEGHDLFFNYGNKGERNIMIKYKGSGLWSRWVYGTDDLSKGYEDLFTLQGNSFGK
 Homo sapiens LLGIGGEDLFFNYGNRQEKINIMIKYKGSGLWSRWKVIYGTDDLSRGEYAMYTLGNANGA
 Mus musculus LFGIKGTELYFNNGRQEKINIKYKGSGLWSRWKVIYGTDDLSRGEYAMYTLGNANGA
 Alligator mississippiensis LFAIQGEDLFFNYGNRQEKINIMIKYKGSGLWSRWKVIYGTDDLSRGEYEDLFLSLLNANGA
 Columba livia LFAIQGEDLFFNYGNRQERNIMIKYKGSGLWSRWKVIYGTDDLSRGEYEDTYTVKNANGA

FN II

Scophthalmus maximus MRC1-2 IATFPFIFYKDRWFGDITTFDSSQKRMIAVETKYEH-ELWGYPTTSR---DHWTXYLVT
 Danio rerio TKCFPPFLYEKKWYADITTVDEPQRLWIAATKTDYSLSYEQWGYPTRDS---KYWTKHPLT
 Takifugu rubripes PQQFPFKFQTKWYSEITKDGRSDRQLWATERDYDMKKKWGFPTKAT---LGDWTDPEVT
 Dicentrarchus labrax PQQFPFKFMEKWIYAEITKDGRSDGQLWATERDYDKKKWGFPTKAT---SGWTDPEVT
 Scophthalmus maximus MRC1-1 PQQLPFFKFGENWYAEITKEGRVDGQLWATERDYDVIKRWGFPTQAS---SGWTDPEVT
 Latimeria chalumnae ANVLPFTFEKKQYAEITIDGRSDGLWIAATTDYDKDKKYGFPFKSTADAFWTKDPLT
 Homo sapiens TIAFPFKFENKWIYADITSAGRSDGWLWGTITDYDIDKDLFGYPLKFEFGESLWLNKDP
 Mus musculus VQAFPPFKFENKWIYADITSAGRSDGWLWGTITDYDIDKDKLFGYPLHFEFGESLWLNKDP
 Alligator mississippiensis PQVFPFKFNNQWYAEITDVGRSDGWLWGTITDVPDVKMYGFPKLFKSGSDTLWLNMDL
 Columba livia PAVFPFKFGDKWIYADITDAGRSDGWFWGTITSDVFDVKMYGFPKLFKNSIGLWLNMDL

CTLD1

Scophthalmus maximus MRC1-2 GTYYQINTQSALTWQAEVSKQQGATLVSIYEPNEQAFIAALLGEGYKLIWIGV-VLDP
 Danio rerio NVYYQLNDRSTLTWYQARKSKQQGAEALLSISEPHEQSFIAAGFMQKSGSLWIGLNKLDV
 Takifugu rubripes GVQYQRNAQSVLSWHQARKSKQQGADLISIVELHEQSYISGLTAFGLTSLWIGLNLDV
 Dicentrarchus labrax GVQYQRNAQSVLNVHQAARKSKQQGADLISIVELHEQSYISGLTFLGTSLWIGLNSLDF
 Scophthalmus maximus MRC1-1 EVQYQRNAQSVLWTHQAARKSKQQGADLISIVELHEQSYISGLTALGTSLWIGLNSLDF
 Latimeria chalumnae GASYYQINGESAVTWHQAARKSKQQADLISIVELHEQYITGLTNDIGTSLWIGLNSLDF
 Homo sapiens SVSYQINSKALSALTWQAARKSKQQNAEALLSITEIHEQTYITGLTSSLTSLWIGLNSLDF
 Mus musculus GILYQINSKALSALTWQAARKSKQQNADLISVTEIHEQMYLTGLTSSLSSGLWIGLNSLDF
 Alligator mississippiensis GAHYQINSQSALTWQAARKSKQQNAEALLSITEIHEQTYITGLTGRLSAALWFGLNSLDF
 Columba livia NVYYQINSEALKWHQAARKSKQQKAELLSITELHEQTYITGLTGRLSAALWFGLNSLDF

Scophthalmus maximus MRC1-2 EHGQWNSNGKPFYRLRWSTGNPLPNFGHNAFLDTEAQHSWQSSSMKKLGYITRYKDMVT
 Danio rerio SSGQWNSNGQPLRYLKLWLGFPSSQPGYNAGVLNKGYNSEWSNDAESEKRGYIQRGRHSV
 Takifugu rubripes ETGWQNSNGSPFRLNWPAGHPSSQPGLSATLNAGKASKWESNAKKNKLGYITRRGNST
 Dicentrarchus labrax ESGQWNSNGNPFYRLNWPAGHPSPSEPGLNATLNAGKASKWESSATKKNKLGYITRRGNST
 Scophthalmus maximus MRC1-1 ESGQWNSNGNPFYRLNWPAGHPSPSSDPGDTATLNVAKASKWESSATKKNKLGYITRRGNST
 Latimeria chalumnae GSGQWNTNGDPPFRLNWLPGNPSPEPKNVNLNPSKSAKWNKEATRNKLGYITRRGNST
 Homo sapiens NSGQWNSDRSPFRLNWLPGSFAEPGKSVSLNPGKNAKWNLEAVQKLGYITRRGNST
 Mus musculus RSGQWAGGSPFRLNWLPGSFAEPGKSVSLNPGKNAKWNLEAVQKLGYITRRGNST
 Alligator mississippiensis NNGQWNSGGSPPFRLNWPVPGSPPEPGKIAALNPAKAKWENQENQKLGYITRRGNST
 Columba livia NSGQWNVGGAFFPRLNWPVPGSPPEPGKIAALNPAKAKWENREDDQKLGYITRRGNAT

Scophthalmus maximus MRC1-2 P----TPTLTEQGFSSPWIYPNGHIFHLQRSL-QTWSNAQIEARKERGDLSVIRNVD
 Danio rerio P--TVPP--EVTGFPSPWIYHSGNYFLHRTK-QTWLEARDIILREGGDLLSILSSTEE
 Takifugu rubripes E--LLPFLTKNQPSFPHNWVPYAGNYFLERNK-MMWRDALAAHKEGGDLASIHNLIEE
 Dicentrarchus labrax S--LPPPPNKDHPSPFPHWVPYAGNYFLERNK-IMWRDALAAHKEGGDLASIHNLIEE
 Scophthalmus maximus MRC1-1 S--LPPPPNKDHPSPFPHWVPYAGNYFLERNK-IMWRDALAAHKEGGDLASIHNLIEE
 Latimeria chalumnae ASSFILPTVNDSEISPKQWVPYAGNYTYIRVA-KIKWEAMTSQKEAGLASVHNIEE
 Homo sapiens LNSFVIPSSEVDPTHPSQWVPYAGNYKIHREDKKIQRDALTRKEGGDLASIHNLIEE
 Mus musculus LNPFIIPASADVPTGPNQWVPYAGNYKIHREDKKIQRDALTRKEGGDLASIHNLIEE

FRANCISCO FONTENLA IGLESIAS

Alligator mississippiensis LESFIIIPSETDMPIMPTQWMSYAGHLYLIHKDL-KIWKDALTFRKEDGDGLASIHNVEE
 Columba livia LESFIIIPSETNVPIRDQWMSYAGHYLIHRDP-KIWKDALTSRKEDGDGLASIHNVEE
 * * * : . : * : * : * * : * : * : * : * : *

CTLD2

Scopthalmus maximus MRC1-2 QSFVISQLGYASSDELWIGLNDRRTEGFFDWSYSAVFTSWEYKPAVST-DGEGVLI
 Danio rerio QSFATITQLGYSKTDQLWIGFNDRKTQMLFEWSDQSSVPFASWEVGEPTSHAQHAEDVLM
 Takifugu rubripes QSFIFSQSGYSPTDVLWIGLNDQRNQLFEWSDRTVPRVTFWQSDPESHAINLQEDVLI
 Dicentrarchus labrax QSFIIISQSGYLPDVLWIGLNDQRNQLFEWSDHSHVTTQWQTGEPESHAINLQEDVLI
 Scopthalmus maximus MRC1-1 QSFIIISQSGYLPDVLWIGLNDQRNQLFEWSDHSHVTTQWQTGEPESHAINLQEDVLI
 Latimeria chalumnae FSFIIISQGYLPDDELWIGLNDLKVQMLFEWSDGTPVTFTRWLRGEPESHANNRQEDVVM
 Homo sapiens LDFIISQLGYEPNDELWIGLNDIKIQMYFEWSDGTPVTFTRWLRGEPESHANNRQEDVVM
 Mus musculus FDFIFSQLGYEPNDELWIGLNDIKIQMYFEWSDGTPVTFTRWLRGEPESHANNRQEDVVM
 Alligator mississippiensis YSFIVSQLGYQPKDELWIGLNDKNQVMYFEWSDGSPVTTYTKWLRGEPETHANNRQEDVVM
 Columba livia YSFVIVSQLGYRPADELWIGLNDLKVQMYFEWSDGTPVTTYTKWLRGEPETHANNRQEDVVM
 * . : * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

Scopthalmus maximus MRC1-2 KGEKGNWADRSDEKHGFIKMQSDTERT-GEEVDLDIGKAGWKRHGSYVYFVGSSETKT
 Danio rerio RGEKGNWADWVDEKYGFIKRRKTSKASNNNDTVANPGKKGWIRYGYVYMAAGSETKT
 Takifugu rubripes RGKEGRWVDHMEKTYGYLKKKASTRPNNGIQEDNPNGLGWIRFHSYVYNIIGSEKKT
 Dicentrarchus labrax KGKDGRAWDHMEKTYGYLKKKASTKLGEGTQEEVNPGLKLSIRFGFYVYNIIGSEKKT
 Scopthalmus maximus MRC1-1 RGKDGRAWDHMEKTYGYLKKRASKPSEGVQEEANPGKLSIRFGSYVYVNGAETKT
 Latimeria chalumnae KGERAYWADHIEKKHSYIKRKPITAP-AEVEQTQEKGRGKWRHGFYVYIGTMTMT
 Homo sapiens KKGADYWRDGEENPLGYIKMKRSRQGP-EIVE-VEKGRKGGKWHHFYVIMIGTLTST
 Mus musculus KGKGDYWRADRAEQPLGYIKMVSQSHAV-VPEG-ADKGRKGGKWRHGFYVYIGTLTST
 Alligator mississippiensis KGKGDYWRADHAEKLGYIKRKPFLGEAP-KEEIVEVEQGRGKWRHGFYVYIGTLTST
 Columba livia KGKDGFWADHSIEKKIYIKRKFMEAP-AEEE-IDVGRGWKRYGFYVYIGTLTST
 : * . : * * * : . : * : * : * : * : * : * : * : * : *

CTLD3

Scopthalmus maximus MRC1-2 FDEAKDEIKSSDSYLADVSNVDNAPLIVSTVGRPRPKYFVWGLSNQKINDEFVNTWTDV
 Danio rerio SEEAKQTEKAESRLVDVSSRVENAFVNLVNGARPEKYEVIWGLSNQKDVTFEWMNTQSV
 Takifugu rubripes FDEATQASALSAYLVDVADRYENAFVSTVGLRPEKYFWTGLSNTADKHLFKWTRRKY
 Dicentrarchus labrax FDDAKRAISEAGAYLVDVADRYENALLVSLVGLRPEKYFWTGLSNTDDRSTFWKTRRKY
 Scopthalmus maximus MRC1-1 FDEATQASVVGANLIDVADRYENAFVLSVGLRPEKYFWGLSNMEDRNTFRWTKTRKY
 Latimeria chalumnae FIEANQTIIGNAYLISVEDRYELAYLTSLIGLRLPEKYFWIWLGNKDDRTFFVWNGDPI
 Homo sapiens FAEANQTIENNENAYLTTIEDRYEQAPLTSFVGLRPEKYFWTGLSDIQTKGTFWTEEBEV
 Mus musculus FTDANHTITNEKAYLTTVEDRYEQAPLTSVGLRPEKYFWTGLSDVQNKGTFFWTEDEQV
 Alligator mississippiensis FFEANQTIQRNQNALASVEDRYEQAYLTSLIGLRLPEKYFWIWLGNKDDRTFFWTSGESV
 Columba livia FSQANQTIQRHQAFLATIEDRYEQAYLTSVGLRLRTERYFWIWLSDVEEKGTFKWNTGDSV
 : * . : * * * : . : * : * : * : * : * : * : * : * : *

Scopthalmus maximus MRC1-2 RFTHWNTPEMPYREGVAMTTGVLVAGLWDLLETNQEKYIKHLAEGAVLTVPPPTQIPP
 Danio rerio PFTHFNSGMPGRKQCVAMTTGIVAGLWDLVLSNKEKYIKQRADALVTTAAAPTTPSL
 Takifugu rubripes TFTNFNIGMPDRNQCVAMTTGIVAGLWDLVSSSKEKYIKKPAEGVQVTVPTTTPSL
 Dicentrarchus labrax TFTNFNVMGPRDRKQCVAMTTGIVAGLWDLVSSNKEKYIKKPAEGVQVTVPTTTPAL
 Scopthalmus maximus MRC1-1 MFTHFNVLPRDRKQCVALTGAFAGLWDLVSSNKEKYIKKPAEGLVTRVPTTTPDL
 Latimeria chalumnae QFTHWNAEMPGRRKAGVAMTTGKAAGLWDLVLSSEKAKFIKKWAEGVTPPPVPTTTPSA
 Homo sapiens QFTHWNSDMPGRKQCVAMRTGIAGLWDLVLDKDEKAKFIKKWAEGVTPPPVPTTTPPE
 Mus musculus QFTHWNAEMPGRRKAGVAMKTGIVAGLWDLVLSSEKAKFIKKWAEGVTPPPVPTTTPPE
 Alligator mississippiensis LFTHWNSDMPGRKQCVAMRTGITAGLWDLVLSSEKAKFIKKWAEGVTPPPVPTTTPPE
 Columba livia LFTHWNSDMPGRKQCVAMRTGIAGLWDLVLSSEKAKFIKKWAEGVTPPPVPTTTPPI
 * * * : * . : * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

Scopthalmus maximus MRC1-2 KADGWTRSGTRNLSKFFTGPRSEKTYEARDYRAIGGDLISIHSAVLLV-----
 Danio rerio DQTEWTSIGTRDLVKNFVPSLQKMTWDQALDYRELGGDLISIHESDI--PWKQ--
 Takifugu rubripes SDESQWTPISNRNVFKIFKSSQLKKTWQEAALDFRAIGGDLISIHSPKDMQNA-----
 Dicentrarchus labrax SDESQWTPAAKRNVYKLYKAKALRKTWNEAQDFRAIGGDLISIHSMQDLNNA-----
 Scopthalmus maximus MRC1-1 SASQWTPADKRNVYKLYKQKDLKKTWHEAQDFRAIGGDLISIHSSQDLNSA-----
 Latimeria chalumnae CQPDGESSPIVNSYFKEYIKDASERKTWFEARDYRAIGGDLISQSRDEEVIWRMIT
 Homo sapiens KPEPDGASSRSTSLFKLYAKGKHEKKTWFESRDFRAIGGDLASINNKEEQQTIVRLIT
 Mus musculus KOPENWGTTSKTSMLFKLYAKGKHEKKTWFESRDFRAIGGELASIKSKDEQQTIVRLIT
 Alligator mississippiensis TQPDGWDNSNRISLFFKPYRSRE--QKKTWFESRDFRAIGGDLATVNGKEQYIWRISIA
 Columba livia RQPDGWDNSNRISLFFKPFYRSGE-EKKTWLESQEFRAIGGDLASINNGKEQYIWRISIA
 * * * : * . : * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

CTLD4

Scopthalmus maximus MRC1-2 ---GRYKAWIGLHVPDPSTGYAWSDGSPVNFQHWQEGPFLNLAESAFKINSWDES
 Danio rerio ---GGYPSWIGYRMYDPSVYGVVWSDGSSSYQSWASDFPFLNLMNEMVEMRVS/LWDD
 Takifugu rubripes -RFLSLSKSAWIGLS-LSASKGFVWSDGSAEYENWGYGEPFLNHNNEHAEILS---YGG
 Dicentrarchus labrax -PFHSDGAWIGFSSLDNQGFWVTWSDGANDFENWGYGEPFLNYNNEHAEVQV---YYG
 Scopthalmus maximus MRC1-1 RRGFYGLVYWMGLNLPDDGYAWSDGSPVMEYKWKYGEPFLNHSLELGGVKG---DSS
 Latimeria chalumnae ASGSYHKLFWLGLTYGSPSEGTWSDGSPVSYENWAYGEPFLNYQVVEYGGKLG---DPT
 Homo sapiens SSGSYHELDFWLGLTYGSPSEGTWSDGSPVSYENWAYGEPFLNYQVVEYGGKLG---DPT
 Mus musculus NSGLYHQNFWIGLFYLNPDGFSWSDGFPVRYENWAFGEPFLNYQVVELVRLTGT---DSS
 Alligator mississippiensis NNGFYNQRFWMLYLNPDGFIWSDGSPVRYENWGFEPFLNYQHLELAEISG---DSS
 Columba livia * * * : * . : * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

FRANCISCO FONTENLA IGLESIAS

Danio rerio
 Takifugu rubripes
 Dicentrarchus labrax
 Scophthalmus maximus MRC1-1
 Latimeria chalumnae
 Homo sapiens
 Mus musculus
 Alligator mississippiensis
 Columba livia

LTWIEANRRKAEGGHLASIRDLSIQAYIELQVFLRKQPMWIGLNSEQNGYFLVWNKWP
 MRWDEARRQDADDADLASILNLPYSQAYITLQISKHNEPVWIGLNSNETGGRFKVWDRWR
 MRWDEARRQDADDADMASILNLPYSQAYITLQISKHNEPVWIGLNSNETGGRFKVWDRWR
 MKWNEAHLNKKQDSELASILDANSQAFVWLQVLYKGEFVWIGMNSMTSMQYITWLDWRW
 FQWHEAETYKLNLSLILDPYSNAFQAWLQMETSNERNVWIALNSLNTDNQYITWTDKWR
 LPWHEAETYKDHTSLLASILDPSYNAFAMWKMHPFNVPWIALNSLNTNNEYITWTDWRW
 MKWEDAKQKTRDLSLDLASILDPSYSHSLWLQILKYGQRIWIGLNSNMTGHEGYEWDNDWK
 MNWEDAKNKKHQDFLSSILDPSYSHSLWLKILKYGVPWAWIGLNSNVTNGRYQVWDRWR
 : * : * . * . . : * : : : * : * : : : : : : *

Scophthalmus maximus MRC1-2
 Danio rerio
 Takifugu rubripes
 Dicentrarchus labrax
 Scophthalmus maximus MRC1-1
 Latimeria chalumnae
 Homo sapiens
 Mus musculus
 Alligator mississippiensis
 Columba livia

MNIAWAEAGEPSSDLPVYMDVEGKWRALTINQTMNSVIMQSTDVPPTESTTFPGIPDE
 MTMEKWAISEPRNKPFAHMKINGEWTSLNETFYFVSEQTTDIPPTLPAQQPGHHPKQ
 MYFTKWKGNPKRNYGVYMDVDRKWKTAFTDNHYSLKRSPDVAPTDPPQLPGIPES
 LSFTKWGTNEPKNNYGVYMDVDRKWKTAFTDTHYSLKKSPDIAPTEPPQLPGIPGP
 LSYTKWGIEEPKNNYGVYMDVDRKWKTAFTNTYFSLKRSPDAPTEPPQLPGIPGP
 LRYTKWDKGEPENNIGAYLTKGTWKTGNDESFYFVSKWSDVVAPEHSPQLAGKPEP
 VRYTNWAADEPKLKSAYVLDLDGAWKTAHNEFSYFVLRKSDIIPATEPPQLPGIPES
 VRYTNWAGADEPKLKSAYVYMDVDRKWKTAFTNTYFVLRKSDIIPATEPPQLPGIPES
 MKYTKWAEAGEPKQKIAVYVLDLDGAWKTFNEFSYFVLRKSNVKAPTDPPQLPGIPET
 MMYTKWAEAGEPKQKIGVYVLDVAGAWKTSNEFSYFSLKKPDVQAPTEPPQLPGIPES
 : : * * * . * . : : * : * . : : * : * : : * * * *

Scophthalmus maximus MRC1-2
 Danio rerio
 Takifugu rubripes
 Dicentrarchus labrax
 Scophthalmus maximus MRC1-1
 Latimeria chalumnae
 Homo sapiens
 Mus musculus
 Alligator mississippiensis
 Columba livia

TSSEYHQSFSWLFPKGHVYLFITE-EVEWANAASSVRRHGILTSIEDPSEQFLRSNLE
 EN----YSLPRWIPFRDSEYAFVTE-MKSWRAARLMTWGAASLASIRDEAEKFIENSLNLE
 TK-----QKTWLPFRGYTYTLNLSVSNWAHASVLDLKMGAALVISEDPEGAFIHENLE
 KK-----RKTWIPFRGHYFSLSSLDVNWASHAVEILKMGASLVSIEDPELEGAFIQONLE
 KK-----RKTWIPFRGHYFSLSSVVENWAHASVEILKMGGLSVSIQDPQEGLEFIQONLE
 QK-----KFWIPFRGHYFMEFAYSRWSYASLELRLGGSLLSIEDHAEHNFIQONLE
 D-----HTAWIPFHGHYFIESSYTRNWQASLELRMGSLVSIESAESSFLSYRVE
 E-----QTAWIPFYGHYFESSFTRSWGQASLELRMGASLVSIIETAESSFLSYRVE
 EE-----RRSWIPFRGHYFESSLTRNWAQASLELRLGAAVLVSEDSAEVDFLANHIE
 EG-----HKSWIPFRGHYFIESSSTRNWAQASLELRLGASLVSIEDSAEANFLYITIE
 : * : * * * . * . : : * : * . : : * : * : : * * * *

Scophthalmus maximus MRC1-2
 Danio rerio
 Takifugu rubripes
 Dicentrarchus labrax
 Scophthalmus maximus MRC1-1
 Latimeria chalumnae
 Homo sapiens
 Mus musculus
 Alligator mississippiensis
 Columba livia

IFQNSHTSFWIGLYKTHKGTWMLDRITVLDYTNWAADEPDSDF-----GNIAIQDG
 LLESY-KEFWIGLLHNHKGHWLWADNSVVDYTNWALTETGGDYEEFSYNPECAFISATSK
 LFDQSAKIFWIGLYKTHEGEWMIIDNSVVDYTNWKGMPNS-----DSCVAISETG
 LLQDSAKSFWIGLYKTHEGEWMIIDNSVVDYTNWKTGMPKS-----DSCVDINSQSG
 LLQDGAKTFWIGLFLKTHEGEWMIIDNSVVDYTNWKTGMPKS-----ESCVINSDSG
 LLTDKPSFHWIGLFRNTDDSIWIDRTPVDFVWVKGVDGEPKQ-----NSECVMYESTSG
 PLKSK-TNFWIGLFRNVEGTWLNNSPVSEVNNWKTGMPKS-----RN-DCVALHSGSG
 PLKSK-TNFWIGMFRNVEGKWLWLNNDPVSFVNNWKTGMPKS-----RN-DCVVLASSSG
 PLEKSSFTFWTGMVRNVDGQWLWLDNTAVDEVNWNVGEPPSQ-----QNEHCVEYANGS
 PLEEKSTFTWGTGLYRNVVDGQWLWLDNSPVNFVNNVGEPPSQ-----QNEHCVEYANGS
 : : * * * : : . * : * : : : : * * * *

Scophthalmus maximus MRC1-2
 Danio rerio
 Takifugu rubripes
 Dicentrarchus labrax
 Scophthalmus maximus MRC1-1
 Latimeria chalumnae
 Homo sapiens
 Mus musculus
 Alligator mississippiensis
 Columba livia

TWQSGHRWH-DRPFIKTKPKVIFQDSDIKPEPH-----GGQDPRSRAHNTLVVVV
 NWKKRHCXYTLVLPFIKTKAKVISPTIKSPHQD-----IKPHRVKTLGAVEL
 LWSTTSCSR-YRSYIKLAKVAPTEAPPSI-----AKVITEPSQSGAGVTVAV
 QWSTNTCSR-YKSYIKTKAKVITPTEKPPAAGKLF-----IAKHVIEEPSHGSAGITVAI
 QWSTNTCSR-YRSYIKTKAKVITPTEKPPSV-----AHIKEASHGSAGITLAI
 AWWNLCTT-YRGYVPIPKIIEPTEKPEPKT-----KKQEGRLPANHAGIVVAV
 FWSNIHCSS-YKGYIKRPKIIDAKPTHLLTTKAD----TRKMDPSKPSNVAGVVIIV
 LWNNIHCSS-YKGYIKMPKIIDPVTTHSSITTKAD----QRKMDPQPKGSSKAGVTVV
 LWNNIHCSS-YKGYIKRKSIVEMKATEKPPDQKAVKGNKDMNEVHAPSHNSAGIVAIV
 YWNNIYCFSS-HKGYIKPKPTIEMPPAAEMPPAEMPTKAMTKDEKPTLNHSHKGTGLVIVV
 : : * * * : : * : * : : * : * : : * : * : : * : * : *

Scophthalmus maximus MRC1-2
 Danio rerio
 Takifugu rubripes
 Dicentrarchus labrax
 Scophthalmus maximus MRC1-1
 Latimeria chalumnae
 Homo sapiens
 Mus musculus
 Alligator mississippiensis
 Columba livia

IIAEVSSLIAIQVFLYKPF-PRLP---TENPLFNSERSOPDVPVTKMIEAAEEIIP
 TIAVIAILGALAYVYRRSQHRFLP---TENPMMNNAESA-YSDKONKSLLEVAE----
 LLVVAIAVGLGAFLLFRKRIHMPVLGDSNEDNKLYFTNPL--RSNVDITNGLVANIENQEQ
 VLVVIAIVLGAFLFRKRIAPVPLGESTEDNKLYFTNPL--RAHVDITKGLVANIENQEQ
 VLVVIAIVLGAFLFRKRIPTPVLGECNEDNKLYFTNPL--RALVDITKGLVANIENQEQ
 VLLVLAGVCVATYFVYKRRQLFPATSDNNEENTLYFNTGTGTS-PSTSDITKGLVANIENQEQ
 ILLILITGAGLAAYFFYKRR-RVHLPEGAEENTLYFNTGTGTS-PGSDMKDLVGNIEQNEH
 VLLIVIGAGVAAYFFYKRRHALHIPQEAENTLYFNSNLS-PGSDTKDLVGNIEQNEH
 VLLILLAGLAGYFFYKRR-NHLSITNDSFENNLNSETV-PGSDTKDLVGNIEQNEH
 VIIILVGSGLAGYLYKRR-KNRLSTHDSFENNLNSETV-PGSDTKDLVGNIEQNEH
 : : : : : * : * : : * : * : : * : * : : * : * : *

Scophthalmus maximus MRC1-2
 Danio rerio
 Takifugu rubripes
 Dicentrarchus labrax

EPIAL

 A-----
 A-----

```

Scophthalmus maximus MRC1-1  A-----
Latimeria chalumnae          ITI---
Homo sapiens                  SVI---
Mus musculus                  AII---
Alligator mississippiensis    VAL---
Columba livia                 ATL---

```

Fig. 4. Alineamiento múltiple generado por CLUSTAL de las secuencias deducidas de aminoácidos de los receptores de manosa de rodaballo con las secuencias del receptor de manosa de otras especies depositadas en la base de datos GenBank. Los aminoácidos idénticos entre todas las especies están marcados con asteriscos (*) debajo de las secuencias. El péptido señal se indicó en cursiva, los residuos conservados de cisteína y los residuos aromáticos F (Phe) y W (Trp) se indicaron con azul y amarillo, respectivamente. Los sitios conservados de dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRD), "EPN" y "WND" aparecen encuadrados. El sitio de unión a Ca⁺² 1 se marcó en rojo y el sitio de unión a Ca⁺² 2 aparece en verde. Dos posibles motivos de endocitosis, "F-N-Y" y el motivo dihidrofóbico "LX" se marcaron en gris. El residuo ácido conservado "D" se marcó en rosa. CR: dominio rico en cisteína. FN II: dominio de fibronectina tipo II. CTLD: dominios tipo lectina de tipo C. Números de acceso del GenBank del receptor de manosa: *Danio rerio* (NP_001297773.1); *Takifugu rubripes* (XP_011606279.1); *Dicentrarchus labrax* (CBN82067.1); *Latimeria chalumnae* (XP_006004830.1); *Mus musculus* (CAA78028.1); *Homo sapiens* (NP_002429.1); *Alligator mississippiensis* (XP_014457049.1); *Columba livia* (XP_005507998.1).

3.2. Relaciones filogenéticas de los receptores de manosa de rodaballo

Comparando las dos secuencias de los receptores de manosa Mrc1 del rodaballo (Mrc1-1 y Mrc1-2), observamos que el valor de identidad entre ambos receptores fue de 44,71% (Fig. 5).

```

Scophthalmus maximus MRC1-1  -----MFP-CLSL-AVILCLLQVICITADIDSGSFLIFNDNHNKCIKVESATSV
Scophthalmus maximus MRC1-2  MSAAVRLIRGRMLTLRITLAAFLFLFILTSQCSTAN--DAQFSLTNKATGFCL-----
                               *:  :*: *:*:* * * ** : ..* : * . * :

```



```

Scophthalmus maximus Mrc1-1      DVDRTWKTASCTNTYYSLCKRSPDTAPTEPPQLPGSCPEPKK-----RKTWIPFRGHGCHYS
Scophthalmus maximus Mrc1-2      DVEGKWRALTALCNQTMNSVCMQSTDVPPTESTTFFPGICPDETSSEYHQSFSLWLPFKGHGCHYL
**:.*:** *.:* *:*:* * .*** :** **:. . :*:**:*

Scophthalmus maximus Mrc1-1      FLSSVVENWAHASVECLKMGGLSVSIQDFQEGFLIQQNLELLQDGAKTFWIGLFKTHEGE
Scophthalmus maximus Mrc1-2      FITEEV-EWANAASSCVRHGGILTSIEDPSEQQFLRSNLEIFQNSHTSFWIGLYKTHKGT
*:. . * :**:* .*: : ** * .**:*.* * :.***:*. . :****:*

Scophthalmus maximus Mrc1-1      WMIIDNSVVDYTNWKTGMPKSESCVINDSDGQWNSNSCSRYRSYICKTAKVITPTEKFP
Scophthalmus maximus Mrc1-2      WMLDRTVLDYTNWAADEPDSDF-GNIATQDGTWQSGHRWHDRPFICKTPKVIQDSDIK
***:*.**:***** . . *.: : * :. . * : * : * * * . .

Scophthalmus maximus Mrc1-1      SVAHIKEASHGSAGITLAIVLVV---IATVGLGAFLLFRKRIPTPVLGECNFDNKLYFN
Scophthalmus maximus Mrc1-2      PEPHGGQDPR-SRAHTTLVVVVI IAFVSSLIAIQVFL--YKFFPRL---IPTFENPLYFN
* :. . * **:*: . : : . ** * : * . * : * * *

Scophthalmus maximus Mrc1-1      NPIR--ALVDTKSLVANIEQNEQA-----
Scophthalmus maximus Mrc1-2      SERSQPDVVDTNKLIENAEIEPEPIIAL
. : * * * : . * : * * :

```

Fig. 5. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los receptores de manosa de rodaballo (Mrc1-1 y Mrc1-2).

Al comparar las secuencias de los receptores de manosa de lectina tipo C de rodaballo (Mrc1-1 y Mrc1-2) con las secuencias de los receptores de manosa de otras especies de peces y otros vertebrados, hemos observado que ambos (Mrc1-1 y Mrc1-2) están dentro del grupo de los receptores de manosa tipo C-1. El análisis del GenBank nos ha permitido encontrar un receptor de manosa del tipo 2 en rodaballo; el cual presenta una mayor similitud con el receptor ortólogo encontrado en mamíferos. Mrc1-1 y Mrc1-2 de rodaballo presentan identidades superiores al 70% con los receptores de manosa de tipo-C 1 del pez limón (*Seriola dumerili*), con el pez globo (*Takifugu rubripes*) o del pez-arroz japonés (*Oryzias latipes*) (Tablas 4 y 5). Dependiendo de la isoforma, los porcentajes de identidad con mamíferos y aves están en torno al 39-50% y entre el 37-49% en reptiles y anfibios (Tablas 4 y 5). La isoforma Mrc1-1 presentan una mayor similitud con el receptor de manosa de mamíferos que la

isoforma Mrc1-2. Los valores de identidad bajan a medida que las especies se alejan en la escala filogenética. En algunas especies de peces se han encontrado las dos isoformas del receptor descritas en este trabajo y, como era de esperar, las isoformas de rodaballo aparecen más cercanas en el árbol filogenético a la isoforma correspondiente en otras especies (Fig. 6).

Species	Accession number	Defenition	Identity	E-value
Greater amberjack (<i>Seriola dumerilli</i>)	XP022622863.1	Macrophage mannose receptor 1	89.77%	0.0
Fugu (<i>Takifugu rubripes</i>)	XP011606279.2	Macrophage mannose receptor 1	76.34%	0.0
Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	XP004081351.2	Macrophage mannose receptor 1	76.20%	0.0
Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	XP021418655.1	Macrophage mannose receptor 1-like	75.09%	0.0
Atlantic cod (<i>Gadus morhua</i>)	XP030204614.1	Macrophage mannose receptor 1	65.61%	0.0
Asian arowana (<i>Scleropages formosus</i>)	XP018612375.2	Macrophage mannose receptor 1 isoform X2	65.35%	0.0
Goldfish (<i>Carassius auratus</i>)	XP026119712.1	Macrophage mannose receptor 1	64.15%	0.0
Coelacanth (<i>Latimeria chalumnae</i>)	XP014349255.1	Macrophage mannose receptor 1 isoform X2	51.75%	0.0
Chicken (<i>Gallus gallus</i>)	NP001305936.1	Mannose receptor C-type 1 precursor	49.79%	0.0
Whale shark (<i>Rhincodon typus</i>)	XP020392010.1	Macrophage mannose receptor 1	49.52%	0.0
House mouse (<i>Mus musculus</i>)	EDL08064.1	Mannose receptor, C type 1	49.29%	0.0
Human (<i>Homo sapiens</i>)	NP002429.1	Macrophage mannose receptor 1 precursor	48.39%	0.0
Common wall lizard (<i>Podarcis muralis</i>)	XP028606641.1	Macrophage mannose receptor 1-like	48.34%	0.0
African clawed frog (<i>Xenopus laevis</i>)	XP018122779.1	Macrophage mannose receptor 1-like	47.48%	0.0
Sterlet (<i>Acipenser ruthenus</i>)	RXM36510.1	Macrophage mannose receptor 1	46.78%	0.0

Tabla 4. Identidad aminoacídica del Mrc1-1 de rodaballo con peces y otros vertebrados, ordenadas de acuerdo a la identidad (%) y al valor-E (E-value).

Species	Accession number	Defenition	Identity	E-value
Greater amberjack (<i>Seriola dumerilli</i>)	XP022613579.1	Macrophage mannose receptor 1-like	84.63%	0.0
Fugu (<i>Takifugu rubripes</i>)	XP011614581.1	Macrophage mannose receptor 1 isoform X2	73.69%	0.0
Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	XP023820886.1	Macrophage mannose receptor 1	68.16%	0.0
Atlantic cod (<i>Gadus morhua</i>)	XP030220618.1	Macrophage mannose receptor 1-like	58.89%	0.0
Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	XP021444367.1	Macrophage mannose receptor 1-like	49.53%	0.0
Whale shark (<i>Rhincodon typus</i>)	XP020392010.1	Macrophage mannose receptor 1	49.39%	0.0
Asian arowana (<i>Scleropages formosus</i>)	XP018612375.2	Macrophage mannose receptor 1 isoform X2	47.07%	0.0
Goldfish (<i>Carassius auratus</i>)	ALS87701.1	Mannose receptor C type 1	44.98%	0.0
Coelacanth (<i>Latimeria chalumnae</i>)	XP014349255.1	Macrophage mannose receptor 1 isoform X2	40.21%	0.0
House mouse (<i>Mus musculus</i>)	EDL08064.1	Mannose receptor, C type 1	39.83%	0.0
Chicken (<i>Gallus gallus</i>)	NP001305936.1	Mannose receptor C-type 1 precursor	39.17%	0.0
Human (<i>Homo sapiens</i>)	NP002429.1	Macrophage mannose receptor 1 precursor	38.94%	0.0
Common wall lizard (<i>Podarcis muralis</i>)	XP028607052.1	Macrophage mannose receptor 1 isoform X1	38.58%	0.0
African clawed frog (<i>Xenopus laevis</i>)	XP018124612.1	Macrophage mannose receptor 1-like	37.91%	0.0
Sterlet (<i>Acipenser ruthenus</i>)	RXM36510.1	Macrophage mannose receptor 1	36.90%	8e-169

Tabla 5. Identidad aminoacídica del Mrc1-2 de rodaballo con peces y otros vertebrados, ordenadas de acuerdo a la identidad (%) y al valor-E (E-value).

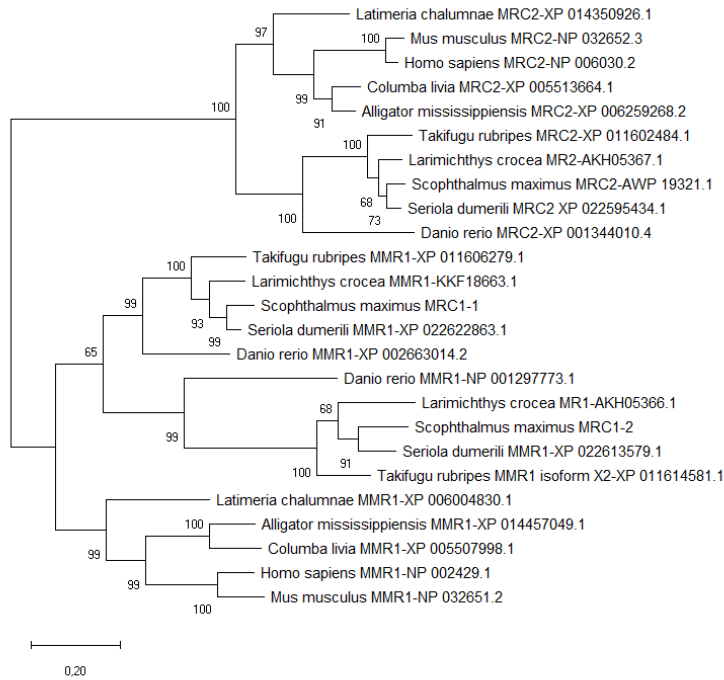


Fig. 6. Árbol filogenético realizado tras la comparación de ambos receptores de manosa de rodaballo con los de otras especies utilizando MEGA X con el método con el método de máxima verosimilitud (*maximun likelihood*). El porcentaje en el que los taxones asociados se agrupan se muestra junto a las ramas. El árbol se dibuja a escala, con longitudes de rama medidas en número de sustituciones por sitio. El análisis incluyó 25 secuencias de aminoácidos. Se eliminaron todas las posiciones en blanco o perdidas. Los números de acceso de GenBank de cada secuencia se indican después de cada nombre de la especie y el nombre del receptor. MRC2: receptor de manosa tipo-C 2; MMR1: receptor de manosa de macrófagos tipo-C 1; MR1: receptor de manosa tipo-C 1.

3.3. Detección del Mrc1-1 mediante Western blot

Analizamos muestras de riñón, bazo y suero mediante Western blot, utilizando el anticuerpo anti-Mrc1-1. No hemos conseguido obtener un buen marcaje a partir de las muestras de bazo y riñón. Al utilizar suero de rodaballo, se obtuvieron dos bandas, la mayor de las cuales coincide con el peso molecular esperado para esa proteína, sin el fragmento citoplasmático y de membrana, que está sobre los 158 kDa (Fig. 7). Sin embargo, es necesario enviar las bandas a espectrometría de masas para confirmar la presencia de la proteína.

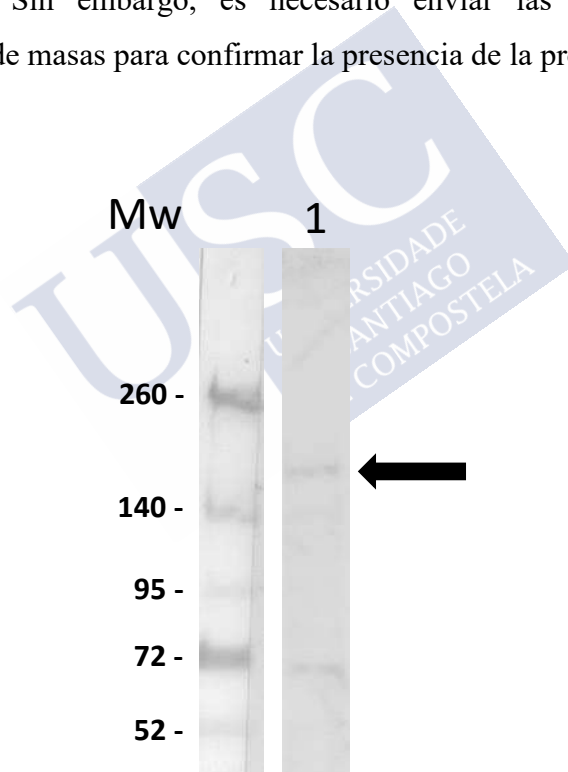


Fig. 7. Western blot realizado a partir de suero de rodaballo usando como anticuerpo primario anti-Mrc1-1. Carril Mw: marcador de peso molecular en kDa. Carril 1: suero. La flecha negra indica la banda que se correspondería con el MRC1-1.

3.4. Expresión basal de *mrc1-1* y *mrc1-2* en diferentes órganos

El gen *mrc1-2* se expresó más que el *mrc1-1* en todos los órganos estudiados. La mayor expresión de ambos genes se observó en el riñón anterior y en el bazo. La expresión de *mrc1-1* es muy baja en el resto de los órganos y tejidos estudiados (branquias, sangre, intestino posterior y anterior, piel con músculo e hígado). La expresión de *mrc1-2* en esos tejidos, aun siendo menor que en el bazo y riñón, es mayor que la expresión de *mrc1-1* (Fig. 8).

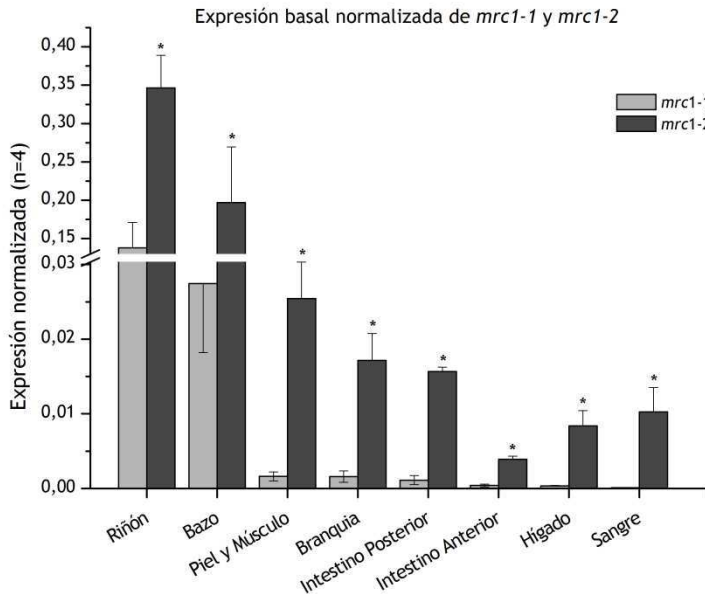


Fig. 8. Análisis de expresión de receptores de manosa en diferentes órganos y tejidos de rodaballo por RT-qPCR. La expresión relativa de los genes *mrc1* se normalizó con respecto a la expresión del gen del factor de elongación 1-alfa. Los datos se muestran como media ± desviación estándar (n=4). Los asteriscos (*) representan diferencias significativas entre ambos receptores en el mismo tejido a $p < 0,05$.

3.5. Análisis de la expresión de *mrc1-1* y *mrc1-2* durante la vacunación

Se analizó la expresión de los dos receptores de manosa en riñón anterior y bazo de peces control y vacunados.

La inyección con adyuvante o con adyuvante y vacuna indujo un incremento en la expresión de *mrc1-1* en el riñón anterior a los tres días tras la inmunización (Fig. 9; gráfico superior). En cuanto a *mrc1-2*, también se observó un aumento significativo de la expresión en peces inyectados con adyuvante o vacuna, pero 7 días después de la primera inyección (Fig. 9; gráfico inferior). No hubo diferencias significativas entre el resto de los grupos en ningún otro de los tiempos analizados para ambos receptores.

En el bazo, las únicas diferencias significativas en la expresión de *mrc1-1* se observaron 7 días y 30 días después de la revacunación en peces inyectados con adyuvante o vacuna (Fig. 10; gráfico superior). La expresión de *mrc1-2* fue significativamente mayor 3 días y 7 días después de la vacunación y 3 días después de la revacunación con adyuvante o vacuna, alcanzando el nivel de expresión máximo 7 días después de la revacunación. Se observó una disminución en la expresión de *mrc1-1* a los 30 días después de la revacunación y no se observaron diferencias significativas entre los cuatro grupos de peces. Además, se encontró una diferencia significativa en peces inoculados con antígeno en comparación con el grupo de control (PBS) 3 días después de la revacunación (Fig. 10; gráfico inferior).

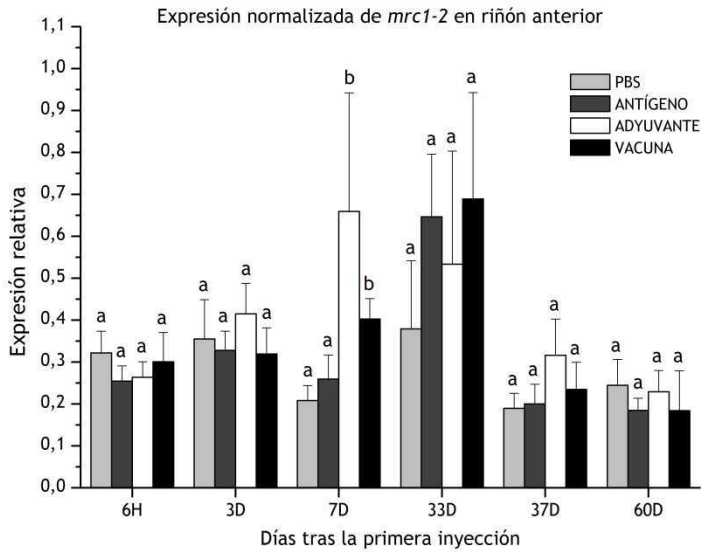
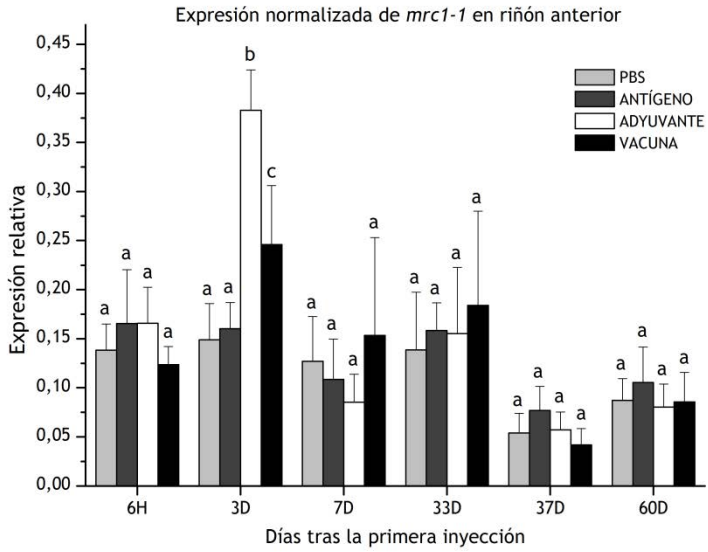
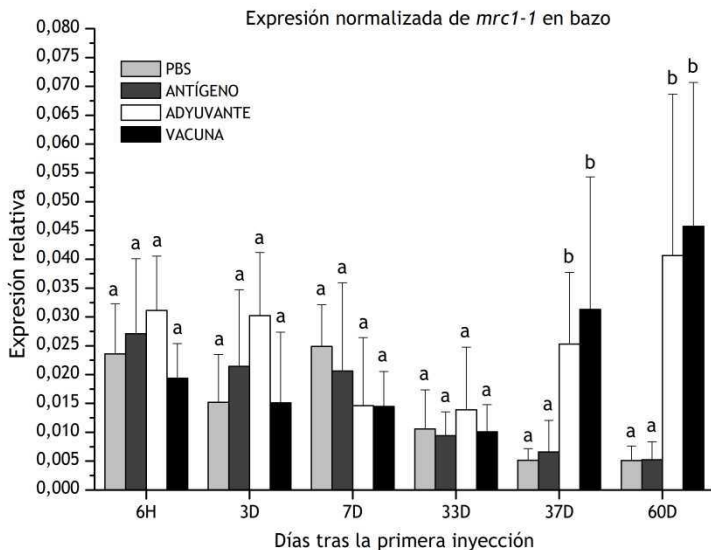


Fig. 9. Análisis de expresión de los receptores de manosa en el riñón anterior del rodaballo mediante RT-qPCR a las 6 h, 3 d y 7 d después de la vacunación, así como 3 d (33D), 7 d (37D) y 30 d (60D) después de la revacunación. El gráfico superior muestra la expresión del gen *mrc1-1* y el gráfico inferior muestra la expresión del gen *mrc1-2*. La expresión relativa de los genes *mrc1* se normalizó a la expresión del gen del factor de elongación 1-alfa. Los datos se muestran como media ± desviación estándar (n=5). La misma letra en las barras significa que no hay diferencias significativas en los grupos de peces (PBS, antígeno, adyuvante, vacuna) al mismo tiempo ($p < 0,05$).



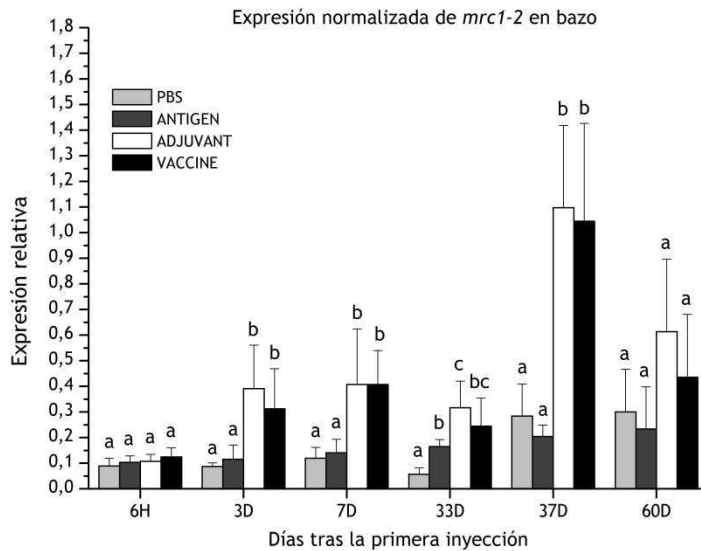


Fig. 10. Análisis de expresión de receptores de manosa en bazo de rodaballo mediante RT-qPCR a las 6 h, 3 d y 7 d después de la vacunación, así como 3 d (33D), 7 d (37D) y 30 d (60D) después de la revacunación. El gráfico superior muestra la expresión del gen *mrc1-1* y el gráfico inferior muestra la expresión del gen *mrc1-2*. La expresión relativa de los genes *mrc1* se normalizó a la expresión del gen del factor de elongación 1-alfa. Los datos se muestran como media \pm desviación estándar (n=5). La misma letra en las barras significa que no hay diferencias significativas en los grupos de peces (PBS, antígeno, adyuvante, vacuna) al mismo tiempo de muestreo ($p < 0,05$).

3.6. Identificación de células Mrc1-1 positivas en riñón anterior y bazo

Se observaron células Mrc1-1 positivas dispersas en zonas de la pulpa roja y pulpa blanca esplénica (Fig. 11 A y B), y entre las agrupaciones de células hematopoyéticas del riñón anterior y posterior (Fig. 11 E y G). En esos órganos, algunos centros melanomacrofágicos mostraron algunas células positivas a su alrededor (Fig. 11C), pero fueron poco abundantes en la mayoría de ellos.

Estas células Mrc1-1 positivas presentan generalmente núcleo ovalado y, ocasionalmente, con una morfología arriñonada (Fig. 11 D). También es interesante destacar que hay células que presentan diferentes intensidades de marcaje (Fig. 11 E y F). Además, hemos observado un ligero marcaje en las células sinusoidales del riñón (Fig. 11 F).

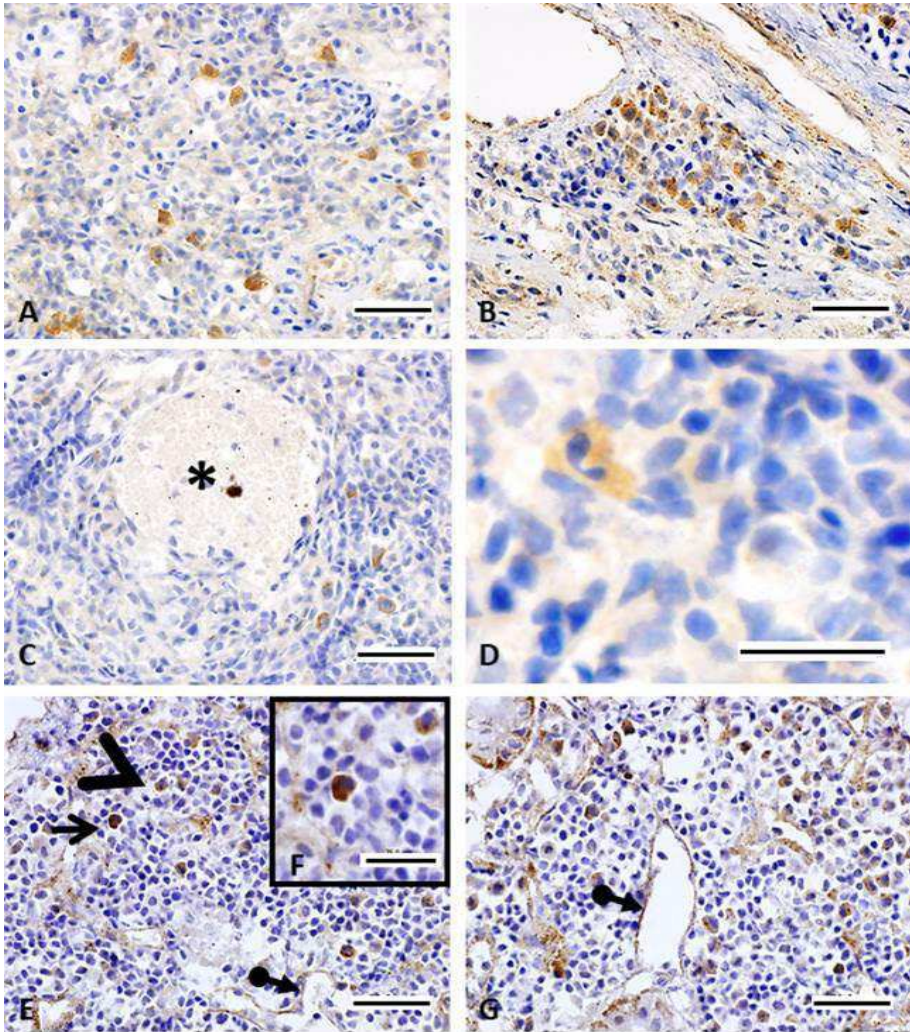


Fig. 11. Fotomicrografías de inmunohistoquímica de células Mrc1-1 positivas en bazo (A-D), riñón anterior (E-F) y riñón anterior-posterior (G). Las células Mrc1-1 positivas aparecen dispersas por todo el bazo (A) y, ocasionalmente, aparecen en grupos (B). Las células inmunorreactivas nunca se muestran dentro del centro melanomacrofágico (*), sino que ocasionalmente los rodean (C). Nótese que algunas células muestran un núcleo arriñonado (D). Las células MRC1-1 positivas del riñón anterior muestran una inmunorreactividad muy marcada

(flecha) o débil (punta de flecha) (E-F) y también se observa un ligero marcaje de las células sinusoidales (flecha con inicio redondo) (E-G). Barras: A, B, C, E y G 50 μm ; D y F 25 μm .

4. Discusión

El receptor de manosa tiene importantes funciones en la homeostasis relacionadas con los procesos de endocitosis, pero también en la internalización de microorganismos patógenos o componentes de los mismos (Keler *et al.*, 2004; Martínez-Pomares, 2012). En este trabajo se han clonado, secuenciado y analizado los transcritos de dos genes ortólogos del *MRC1* (receptor de manosa de tipo C 1, CD206) de mamíferos (East *et al.*, 2002), los cuales hemos denominado *mrc1-1* y *mrc1-2*. Estos genes muestran estructuras muy conservadas en relación a los receptores de manosa de varias especies estudiadas, tal y como han mostrado estudios previos en peces (Liu *et al.*, 2014, Zheng *et al.*, 2015). Las moléculas Mrc1-1 y Mrc1-2 de rodaballo presentan una organización similar con un dominio rico en cisteína, un dominio de fibronectina tipo II, 8 dominios de lectina de tipo C, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático; organización idéntica a la observada en otras especies de peces y en mamíferos (Martínez-Pomares, 2012; Zheng *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014). Además, al comparar las secuencias aminoacídicas, hemos observado que ambos receptores presentan una elevada similitud con las especies filogenéticamente más cercanas, observándose identidades superiores al 80%. Por otro lado, el tamaño

de la molécula es similar a lo encontrado en otras especies de peces: 163,2 kD en el pez cebra (*Danio rerio*) (Zheng *et al.*, 2015), 163,5 kDa en la carpa de Wuchang (*M. amblycephala*) (Liu *et al.*, 2014) y 163,7 kDa en la carpa china (*Ctenopharyngodon idella*) (Wang *et al.*, 2014). Sin embargo, mientras que en aves se han descrito hasta cinco genes parálogos del MRC1 (Staines *et al.*, 2014), en rodaballo hemos encontrado dos, las cuales, y tras realizar la búsqueda en el GenBank, son similares a lo encontrado en otras especies de peces, donde también se han encontrado dos. Además, en rodaballo y en otras especies de peces, hemos encontrado en la base de datos GenBank (NCBI) un gen ortólogo del gen *MRC2* de mamíferos (*mrc2* del rodaballo: número de acceso AWP19321.1).

Hemos determinado la expresión basal de los dos receptores de manosa en varios órganos de rodaballo. Tal y como se ha observado en pez cebra (Zheng *et al.*, 2015), la mayor expresión de *mrc1-1* y *mrc1-2* se dio en el riñón anterior, aunque existen diferencias en cuanto a la expresión en otros órganos. Existe poca información disponible acerca de la expresión diferencial de las isoformas del MRC1. Al igual que en el pollo, *Gallus gallus*, en rodaballo se da expresión diferencial de los dos parálogos en varios de los tejidos analizados (Staines *et al.*, 2014).

Aunque se ha analizado la respuesta del receptor de manosa en infecciones experimentales frente a *Aeromonas sobria* (Zheng *et al.*, 2015) o *Aeromonas hydrofila* (Wang *et al.*, 2014) hasta ahora no se ha

estudiado en detalle la respuesta del mismo a la vacunación, aunque Liu *et al.* (2014) estimularon *M. amblycephala* con *A. hydrofila* inactivada. En el presente trabajo se ha estudiado la expresión génica a varios tiempos tras la inmunización en riñón anterior y bazo, encontrándose una regulación positiva en ambos órganos en los grupos inyectados con Montanide o vacuna. Sin embargo, cuando las hay, las diferencias de expresión entre grupos son bajas y no hemos podido determinar si se deben a cambios en las poblaciones celulares por migración celular o a cambios en la expresión del propio gen. En los estudios realizados con infecciones experimentales en peces se ha observado un incremento en la expresión del receptor de manosa (Wang *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2015), con mayores diferencias que las encontradas en nuestros experimentos en rodaballo. Sin embargo, se sabe que las infecciones pueden provocar una mayor respuesta inmunitaria que las vacunaciones (Slifka y Amanna, 2014). Por otro lado, es posible que la infección experimental genere mayores cambios en las poblaciones celulares en los órganos linfoides.

En este estudio se ha desarrollado un anticuerpo frente al Mrc1-1 que reconoce una banda que en principio coincide con el tamaño esperado, teniendo en cuenta que se habría detectado una forma soluble del receptor de manosa. En los mamíferos se ha descrito también una forma soluble del receptor de manosa que mantiene la capacidad de unir azúcares y que podría suponer un 20% de proteína del total del receptor de manosa (Figdor *et al.*, 2002). El tamaño del

receptor de manosa observado mediante Western blot en *M. amblycephala* es de 180 kDa (Wu *et al.*, 2018) y en conejo de 175 kDa (Wileman *et al.*, 1986). En cualquier caso, queda por confirmar mediante espectrometría de masas que la banda contiene el receptor de manosa. Con este anticuerpo hemos identificado por primera vez en rodaballo células Mrc1-1 positivas en órganos relacionados con el sistema inmunitario, tales como riñón anterior y bazo. La distribución del receptor de manosa no está apenas estudiada en peces. Hasta donde sabemos, tan solo Wu *et al.* (2018) han realizado un estudio de la distribución de células Mrc positivas en la carpa de Wuchang (*M. amblycephala*), durante la embriogénesis. En ejemplares adultos, sus hallazgos coinciden con los nuestros, encontrando células dispersas a lo largo del parénquima del bazo o alrededor de los vasos sanguíneos del riñón anterior. Los macrófagos y células dendríticas son células portadoras del receptor de manosa en mamíferos (Martínez-Pomares, 2012). La morfología de las células Mrc1-1 positivas detectadas es compatible con la de macrófagos. Sin embargo, el anticuerpo no reconoce melanomacrófagos. Es posible que la actividad endocítica mediada por este receptor se vea disminuida o anulada en estas células.

En este trabajo se han dilucidado la estructura, relaciones filogenéticas y expresión de dos isoformas del receptor de manosa de tipo 1 en rodaballo; un receptor muy poco conocido en peces.

Además, se ha generado un anticuerpo frente a la isoforma 1, con lo que se ha podido identificar las células que presentan dicho receptor.

Para completar el estudio, sería necesario el desarrollo de anticuerpos frente a la isoforma 2, con el fin de determinar si ambos receptores colocalizan en las mismas células o en células distintas y analizar en mayor detalle cómo se modula la expresión de ambas isoformas de este receptor.

5. Bibliografía

- Asthana, S., Gupta, P.K., Jaiswal, A.K., Dube, A., Chourasia, M.K. (2015). Overexpressed macrophage mannose receptor targeted nanocapsules-mediated cargo delivery approach for eradication of resident parasite: in vitro and in vivo studies. *Pharm. Res.*, 32(8): 2663-2677. doi: 10.1007/s11095-015-1651-0
- Burgdorf, S., Lukacs-Kornek, V., Kurts, C. (2006) The mannose receptor mediates uptake of soluble but not of cell-associated antigen for cross-presentation. *J. Immunol.* 176(11): 6770- 6776. doi: 10.4049/jimmunol.176.11.6770
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.*, 55(4): 611-622. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797

- Bustin, S.A., Wittwer, C.T. (2017). MIQE: A Step Toward More Robust and Reproducible Quantitative PCR. *Clin. Chem.*, 63(9): 1537-1538. doi: 10.1373/clinchem.2016.268953
- Dong, X., Li, J., He, J., Liu, W., Jiang, L., Ye, Y., Wu, C. (2016). Anti-infective mannose receptor immune mechanism in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Fish Shellfish Immunol.*, 54: 257-265. doi: 10.1016/j.fsi.2016.04.006
- East, L., Rushton, S., Taylor, M.E., Isacke, C.M. (202). Characterization of sugar binding by the mannose receptor family member, Endo180. *J. Biol. Chem.*, 277(52): 50469-50475. doi:10.1074/jbc.M208985200
- Figdor, C.G., van Kooyk, Y., Adema, G.J. (2002). C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat. Rev. Immunol.*, 2(2): 77-84. doi: 10.1038/nri723
- Fontenla, F., Blanco-Abad, V., Pardo, B.G., Folgueira, I., Noia, M., Gómez-Tato, A., Martínez, P., Leiro, J.M., Lamas, J. (2016). Vaccine-induced modulation of gene expression in turbot peritoneal cells. A microarray approach. *Mol. Immunol.*, 75: 188-99. doi: 10.1016/j.molimm.2016.06.001
- Gruden-Movsesijan, A., Milosavljevic LjS. (2006). The involvement of the macrophage mannose receptor in the innate immune response to infection with parasite *Trichinella spiralis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 109(1-2): 57-67. doi: 10.1016/j.vetimm.2005.07.022

- Keler, T., Ramakrishna, V., Fanger, M.W. (2004). Mannose receptor-targeted vaccines. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 4(12): 1953-1962. doi: 10.1517/14712598.4.12.1953
- Klaver, E.J., Kuijk, L.M., Lindhorst, T.K., Cummings, R.D., van Die, I. (2015). *Schistosoma mansoni* soluble egg antigens induce expression of the negative regulators SOCS1 and SHP1 in human dendritic cells via interaction with the mannose receptor. *PLoS One*, 10(4): e0124089. doi: 10.1371/journal.pone.0124089
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.*, 35(6): 1547-1549. doi: 10.1093/molbev/msy096
- Lamas, J., Sanmartín, M.L., Paramá, A.I., Castro, R., Cabaleiro, S., Ruiz de Ocenda, M.V., Barja, J.L., 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: 10.1016/j.aquaculture.2008.03.015
- Liu, X., Tang, X., Wang, L., Li, J., Wang, H., Wei, S., Fang, R., Ji, W., Yuan, G., Chen, N., Gu, Z., Liu, X., Wang, W., Asim, M., Zhou, Y., Lin, L. (2014). Molecular cloning and expression analysis of mannose receptor in blunt snout bream

- (*Megalobrama amblycephala*). Mol. Biol. Rep., 41(7): 4601-4611. doi: 10.1007/s11033-014-3331-2
- Lo, Y.L., Liou, G.G., Lyu, J.H., Hsiao, M., Hsu, T.L., Wong, C.H. (2016). Dengue virus infection is through a cooperative interaction between a mannose receptor and CLEC5A on macrophage as a multivalent hetero-complex. PLoS One, 11(11): e0166474. doi: 10.1371/journal.pone.0166474
- Macedo-Ramos, H., Batista, A.F., Carrier-Ruiz, A., Alves, L., Allodi, S., Ribeiro-Resende, V.T., Teixeira, L.M., Baetas-da-Cruz, W. (2014). Evidence of involvement of the mannose receptor in the internalization of *Streptococcus pneumoniae* by Schwann cells. BMC Microbiol., 14: 211. doi: 10.1186/s12866-014-0211-9
- Martínez-Pomares, L., Mahoney, J.A., Kaposzta, R., Linehan, S.A., Stahl, P.D., Gordon, S. (1998). A functional soluble form of the murine mannose receptor is produced by macrophages in vitro and is present in mouse serum. J. Biol. Chem., 273(36): 23376-2380. doi: 10.1074/jbc.273.36.23376
- Martínez-Pomares, L. (2012). The mannose receptor. J. Leukoc. Biol., 92(6): 1177-1186. doi: 10.1189/jlb.0512231
- Nguyen, D.G., Hildreth, J.E. (2003) Involvement of macrophage mannose receptor in the binding and transmission of HIV by macrophages. Eur. J. Immunol., 33(2): 483-493. doi: 10.1002/immu.200310024

- Schmittgen, T.D., Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.*, 3: 1101-1108. doi: 10.1038/nprot.2008.73
- Slifka, M.K., Amanna, I. (2014). How advances in immunology provide insight into improving vaccine efficacy. *Vaccine*, 32(25): 2948-2957. doi:10.1016/j.vaccine.2014.03.078
- Staines, K., Hunt, L.G., Young, J.R., Butter, C. (2014). Evolution of an expanded mannose receptor gene family. *PLoS One*, 9(11): e110330. doi: 10.1371/journal.pone.0110330
- Taylor, P.R., Gordon, S., Martinez-Pomares, L. (2005). The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition. *Trends Immunol.*, 26(2): 104-110. doi: 10.1016/j.it.2004.12.001
- Wang, L., Liu, L., Zhou, Y., Zhao, X., Xi, M., Wei, S., Fang, R., Ji, W., Chen, N., Gu, Z., Liu, X., Wang, W., Asim, M., Liu, X., Lin, L. (2014). Molecular cloning and expression analysis of mannose receptor C type 1 in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Dev. Comp. Immunol.*, 43(1): 54-58. doi: 10.1016/j.dci.2013.10.006
- Weis, W.I., Taylor, M.E., Drickamer, K. (1998). The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol. Rev.*, 163: 19-34. doi: 10.1111/j.1600-065X.1998.tb01185.x
- Wileman, T.E., Lennartz, M.R., Stahl, P.D. (1986). Identification of the macrophage mannose receptor as a 175-kDa membrane

protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83(8): 2501-2505. doi: 10.1073/pnas.83.8.2501

Wu, C., Zhao, X., Babu V S., Yuan, G., Wang, W., Su, J., Liu, X., Lin, L. (2018). Distribution of mannose receptor in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) during the embryonic development and its immune response to the challenge of *Aeromonas hydrophila*. Fish Shellfish Immunol., 78(6): 52-59. doi: 10.1016/j.fsi.2018.03.049

Zheng, F., Asim, M., Lan, J., Zhao, L., Wei, S., Chen, N., Liu, X., Zhou, Y., Lin, L. (2015). Molecular cloning and functional characterization of mannose receptor in zebra fish (*Danio rerio*) during infection with *Aeromonas sobria*. Int. J. Mol. Sci., 16(5): 10997-11012. doi: 10.3390/ijms160510997.



CAPÍTULO IV

PEROXIDASA DE NEUTRÓFILOS DE RODABALLO. CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS FUNCIONAL



Peroxidasa de neutrófilos de rodaballo.

Caracterización y análisis funcional

1. Introducción

La mieloperoxidasa (MPO) pertenece al grupo de las hemoperoxidasas (Singh *et al.*, 2018), un grupo de enzimas que participan en la defensa del hospedador, la síntesis de hormonas y la patogénesis (Zederbauer *et al.*, 2007). La MPO de los mamíferos la expresan principalmente los neutrófilos, aunque, en un grado mucho menor, también se expresa en otros tipos celulares como los monocitos y los macrófagos (de Araujo *et al.*, 2013). La información sobre la MPO de otros grupos de vertebrados es muy escasa. Esta enzima parece estar presente en los heterófilos de algunas especies de aves, pero está ausente en muchas otras (Genovese *et al.*, 2013; Salakij *et al.*, 2019). Se ha encontrado actividad peroxidasa en los heterófilos de reptiles (Chen *et al.*, 2018) y en los neutrófilos de anfibios (Bricker *et al.*, 2012). Sin embargo, falta información sobre el gen de la MPO en esos grupos de vertebrados. En el caso de los peces, se ha encontrado actividad peroxidasa en neutrófilos de muchas especies de teleósteos (Hine y Wain, 1988) y el gen de la *mpo* se ha descrito en el pez cebra (*Danio rerio*) (Bennett *et al.*, 2001), rodaballo (Castro *et al.*, 2008a), carpa dorada (*Carassius auratus*) (Podok *et al.*, 2014), pez gato (*Ictalurus punctatus*) (Yeh y Klesius, 2010), *rock*

bream (*Oplegnathus fasciatus*) (Elvitigala *et al.*, 2015) o *Orange-spotted grouper* (*Epinephelus coioides*) (Wang *et al.*, 2018).

La MPO está bien caracterizada en mamíferos, particularmente en humanos. La MPO funcional madura es un homodímero, en el que cada protómero contiene una cadena ligera y pesada y un grupo hemo unido covalentemente (Fiedler *et al.*, 2000; Grishkovskaya *et al.*, 2017). La síntesis de MPO ocurre en precursores de neutrófilos, pero no en células maduras. La síntesis comienza con la generación de una pre-MPO que después de la escisión del péptido señal y la glucosilación se transforma en una ApoproMPO inactiva, que se vuelve activa (proMPO) después de la adquisición del grupo hemo en el retículo endoplásmico. Finalmente, después de la escisión de la región prepéptido y la dimerización, la proMPO se convierte en MPO madura (Grishkovskaya *et al.*, 2017; Nauseef, 2018). En presencia de peróxido de hidrógeno, la MPO cataliza la oxidación de iones de haluro para generar ácido hipocloroso (HOCl) y otras sustancias que juegan un papel importante en la destrucción microbiana (Klebanoff, 2005). Además de este papel en la producción de oxidantes importantes y en la defensa del hospedador, la MPO también tiene muchas funciones inmunes y fisiológicas, incluido un importante papel en la respuesta inflamatoria (Aratani, 2018; Vanhamme *et al.*, 2018). Las interacciones proteína-proteína de la mieloperoxidasa con otras proteínas son cruciales en la inmunidad humana innata y adquirida (Arnhold y Flemmig, 2010). La MPO se une a la integrina

CD11b/CD35 y puede mediar la adhesión celular (Johansson *et al.*, 1997), retardar la apoptosis de neutrófilos (El Kebir *et al.*, 2008) o actuar como modulador autocrino inmune que activa los neutrófilos humanos y aumenta la expresión de CD11b y la translocación nuclear de NFκB (Lau *et al.*, 2005; Arnhold y Flemmig, 2010). La presencia de LFA-1 (antígeno-1 asociado a la función del linfocito) en monocitos y células NK (Harris *et al.*, 2000) puede indicar también una posible modulación de ambas poblaciones de leucocitos por la MPO (Lau *et al.*, 2005). La MPO también es necesaria para la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET), que son estructuras compuestas de cromatina descondensada y proteínas que tienen un efecto antimicrobiano (Metzler *et al.*, 2011).

A pesar de ser una enzima importante en los neutrófilos de muchas especies, se tiene poca información acerca de la Mpo de peces. La región codificante de la Mpo de peces codifica una proteína de 884 aminoácidos en el *rock bream* (*Oplegnathus fasciatus*) (Elvitigala *et al.*, 2015), 771 aminoácidos en el pez gato americano (*Ictalurus punctatus*) (Yeh y Klesius, 2010), 770 aminoácidos en el *orange-spotted grouper* (*Epinephelus coioides*) (Wang *et al.*, 2018) o 762 aminoácidos en el pez cebra (*Danio rerio*) y en la carpa dorada (*Carassius auratus*) (Bennett *et al.*, 2001; Podok *et al.*, 2014). De manera similar a lo que se ha encontrado en los mamíferos, la Mpo de peces tiene péptido señal, propéptido, cadena ligera y cadena pesada (Elvitigala *et al.*, 2015). La Mpo se expresa principalmente en los

órganos linfohematopoyéticos de los peces (Wang *et al.*, 2018) y la sangre (Elvitigala *et al.*, 2015), y la expresión génica en los órganos puede cambiar durante la infección (Elvitigala *et al.*, 2015). Existen muy pocos estudios funcionales sobre la Mpo de peces. La actividad de la Mpo de rodaballo disminuye después de la desglicosilación (Castro *et al.*, 2008a) y después del tratamiento con el resveratrol (Castro *et al.*, 2008b).

En un estudio previo, hemos caracterizado parcialmente la mieloperoxidasa de rodaballo (Castro *et al.*, 2008b). En este estudio, hemos completado la caracterización del gen y la proteína de esta peroxidasa del rodaballo y también hemos realizado varios estudios funcionales, para determinar cómo se regula su actividad y cómo esta enzima puede modificar la expresión de otros genes relacionados con el sistema inmunitario.

2. Material y métodos

2.1. Animales de experimentación

Se utilizaron rodaballos, *Scophthalmus maximus*, de aproximadamente 100 g de peso, obtenidos de una piscifactoría local. Los rodaballos se mantuvieron en tanques de 250 l en agua marina en recirculación a 16 °C, alimentándose diariamente con piensos comerciales. Todos los protocolos experimentales realizados en el presente estudio siguieron la legislación europea (Directiva 2010/63/UE) y los requisitos legislativos españoles relacionados con

el uso de animales para experimentación (RD 53/2013) y fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Santiago de Compostela. Para todos los procedimientos, los peces se anestesiaron por inmersión en una disolución de 100 mg/l de tricaina metano sulfonato (MS-222) (Sigma-Aldrich) en agua de mar. La eutanasia se llevó a cabo por decapitación.

2.2. Obtención de leucocitos de riñón anterior

Los leucocitos de riñón anterior se obtuvieron siguiendo la metodología descrita por Castro *et al.* (1999). Brevemente, el riñón anterior se extrajo asépticamente y se colocó en una placa de Petri que contenía medio L-15 (Sigma-Aldrich) con suero fetal bovino al 2% (FBS) (Sigma-Aldrich). Se pasaron pequeños trozos de riñón anterior a través de una malla de nailon de 100 μm con un pistilo de vidrio y la suspensión celular resultante se colocó en capas en un gradiente Percoll 34%/48% v/v. Después de la centrifugación a 400 g durante 30 minutos a 4 °C, las células de la interfase se recogieron, se lavaron dos veces con medio L-15 que contenía FBS al 2% y se suspendieron a una concentración de 2×10^7 células viables/ml en el mismo medio.

2.3. Extracción de ADN y ARN

El ADN y el ARN total de los leucocitos de riñón anterior (10^7 células/ml) se extrajeron respectivamente con un kit de purificación de ADN genómico (*Genomic DNA Purification Kit*) y un kit de

purificación de ARN (*GeneJET RNA Purification Kit*) (Thermo Scientific), de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. La concentración y pureza del ácido nucleico se cuantificó utilizando el espectrofotómetro Nanovue Plus (GE Healthcare). El ARN total se trató, antes de usarse, con RQ1 ADNasa libre de ARNasa (Promega), para evitar cualquier contaminación por ADN, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

2.4. Clonación y secuenciación del gen de la mieloperoxidasa de rodaballo

En base a la secuencia de mieloperoxidasa de rodaballo depositada en la base de datos GenBank (NCBI), con el número de acceso EF112175, se diseñaron cebadores específicos (Tabla 1) para las reacciones de amplificación rápida de los extremos 5' y 3' de ADNc (RACE) de acuerdo con las instrucciones del kit RACE 5'/3' (Roche). Los productos de amplificación de tamaño esperado se cortaron del gel de agarosa al 1%, se purificaron con Ultrafree-DA (Millipore), se subclonaron en el vector pGEM-T Easy (Promega) y, finalmente, se transformaron en células competentes de la cepa DH5 α de *Escherichia coli*. Las colonias blancas se amplificaron en medio LB y el ADN plasmídico se purificó con el kit *NucleoSpin Plasmid* (Machery-Nagel), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los plásmidos positivos detectados por electroforesis se enviaron a Sistemas Genómicos (Valencia) para su secuenciación.

Nombre del cebador	Secuencia del cebador (5'-3')	Longitud del fragmento amplificado	Reacción RACE
MPOR2 GSP	TGGTGACTCTTTTGCGAGTG	428 bp	5'RACE
MPOR5 GSP	GATGCTGGGGGAGAAGGGCGTGAAG	205 bp	5'RACE
MPOF1 GSP	AATGTTGACCCAGCATCTC	950 bp	3'RACE
MPOF2 GSP	AGGCCCCAGTGATAGCTGTA	1056 bp	3'RACE
MPOF3 GSP	GGTCGGTTTGTTTGACGTTT	103 bp	3'RACE

Tabla 1. Secuencia de los cebadores específicos para las reacciones RACE 5' y 3'.

La secuencia completa de ADNc de la *mpo* se usó para diseñar cuatro conjuntos de cebadores para localizar los intrones en el gen (Tabla 2). La PCR se llevó a cabo con 40 ng de ADN genómico de leucocitos de riñón anterior. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 5 min a 94 °C para la desnaturalización inicial, 35 ciclos de desnaturalización de 30 s a 94 °C, una hibridación de 45 s a 60 °C, extensión de 90 s a 72 °C y una extensión final a 72 °C durante 7 min. Los productos de la PCR se clonaron y secuenciaron como se describió anteriormente. Las secuencias de los fragmentos de ADNc se ensamblaron a mano para producir la secuencia completa del gen de la mieloperoxidasa.

Nombre del cebador	Secuencia del cebador (5'-3')
MPOF1	TCGCATCACAACCTTCAGCTT
MPOR1	AGGGCGTGAAGGTGAGATCG
MPOF2	TGGAACAACCGAACATTGAA
MPOR2	GAGATGCTGGGGTCAACATT
MPOF3	CGGACACAGATAGGCCCTTA
MPOR3	CCTGAGTTGTCCGAGCAGAT
MPOF4	AGGCCCCAGTGATAGCTGTA
MPOR4	CGACCAGAAAAAGCACAACA

Tabla 2. Secuencias de los cebadores utilizados para la identificación de los intrones de la mieloperoxidasa de rodaballo.

2.5. Análisis bioinformático

El programa BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) se utilizó para analizar las secuencias de nucleótidos y buscar secuencias de proteínas de otras especies en la base de datos. Las secuencias obtenidas para el gen de la mieloperoxidasa se alinearon con el software CLUSTAL W y se editaron con el editor de alineación múltiple Jalview V1.8. Los sitios que contienen huecos se excluyeron. Se realizaron alineamientos de secuencias múltiples utilizando el programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). La identificación de los dominios de las proteínas y su análisis funcional se realizó utilizando la herramienta InterProScan (versión 4.8) del Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI) disponible en el sitio web: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>. Para

determinar las propiedades fisicoquímicas de la proteína a partir de la secuencia de aminoácidos se utilizó la herramienta de bioinformática ProtParam del servidor ExPASy disponible en la siguiente dirección: <https://web.expasy.org/protparam/>. Para predecir la presencia y ubicación de sitios de escisión de péptidos señal en secuencias de aminoácidos se utilizó el servidor Signal-3L disponible en: <http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Signal-3L/>. El servidor NetNGlyc se usó para predecir sitios de N-glicosilación (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). El software de análisis filogenético MEGA-X (Kumar *et al.*, 2018). se utilizó para construir un árbol de máxima verosimilitud (*maximun likelihood tree*), empleado para analizar las relaciones genéticas entre genes de diferentes especies.

2.6. Recolección y procesamiento de tejidos

La sangre se extrajo por punción de la vena caudal, se dejó coagular durante 16 h a 4 °C, se centrifugó y se recogió el suero. Asimismo, se tomaron muestras de riñón anterior, bazo, glóbulos blancos sanguíneos y líquido peritoneal para inmunofluorescencia que se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS 0,1 M durante toda la noche a 4 °C. En riñón y el bazo se lavaron dos veces en PBS, se crioprotegieron con sacarosa al 30% en PBS, se embebieron en compuesto OCT (Tissue Tek) y se congelaron en un baño de isopentano enfriado con nitrógeno líquido. A partir de estas muestras,

se obtuvieron secciones (4 μm de espesor) en un criostato (Leica CM1850) en portaobjetos StarFrost (Waldemar Knittel) y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para obtener los glóbulos blancos, la sangre heparinizada se diluyó 1:4 en medio L-15 y se estratificó en un gradiente de Percoll al 34%/48% v/v, como se indicó anteriormente. Después de la centrifugación, se recogieron las células de la interfase y se lavaron dos veces con L-15 a $300 \times g$ durante 10 min. El precipitado se congeló en nitrógeno líquido y se guardó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Además, muestras de riñón, corazón, cerebro, músculo, bazo, intestino anterior, intestino medio, intestino posterior, branquias, páncreas, los glóbulos blancos, el estómago y el hígado se extrajeron y congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.7. Análisis de las muestras por Western blot

La proteína total de los glóbulos blancos sanguíneos de rodaballo, suero y líquido peritoneal se extrajo usando tampón de extracción celular (Life Technologies) y se corrió en un gel Mini-PROTEAN® TGX™ (Bio-Rad) al 4–20% en condiciones reductoras y no reductoras. La mieloperoxidasa liofilizada (disuelta en agua destilada) también se separó en condiciones reductoras. Las proteínas se transfirieron con una *Trans-Blot SD semi-dry transfer cell* (BioRad) sobre una membrana de nitrocelulosa de tamaño de poro de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ (Bio-Rad).

Posteriormente, la membrana se bloqueó con tampón de bloqueo y se incubó con anticuerpos de suero de ratón anti-Mpo (1:400) durante toda la noche a 4 °C y, a continuación, con anticuerpos antiratón de conejo marcados con peroxidasa (1:1000) (Dako) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se le añadió 0,06% de clorhidrato de tetrahidrocloreuro de 3,3'-diaminobencidina-níquel (Sigma) y 0,003% H₂O₂ durante 10 min. La membrana se fotografió con una cámara Panasonic DMC-TZ4. La recolección de glóbulos blancos y la purificación de la mieloperoxidasa y la preparación del antisuero contra mieloperoxidasa se llevaron a cabo según lo descrito por Couso *et al.* (2001) y Castro *et al.* (2008a; 2008b), respectivamente.

2.8. Inmunofluorescencia

En primer lugar, se procedió a la recuperación antigénica calentando los portaobjetos en tampón citrato 0,01 M (pH 6,0) durante 30 min en un baño a 95 °C. La autofluorescencia se eliminó con glicina 0,1 M (pH 2,3) (Sigma-Aldrich) durante 10 min a temperatura ambiente, según lo descrito por Zhang *et al.* (2010). Para reducir el fondo, los portaobjetos se incubaron con suero normal de caballo al 2,5% (Vectorlabs) durante 30 min a temperatura ambiente. Las secciones se incubaron luego toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario hecho en ratón (anti-Mpo policlonal; 1:400) en diluyente de anticuerpo (Dako). Posteriormente, las secciones se lavaron tres veces

con TBS-Tween 0,05% y otras tres con TBS. El anticuerpo secundario *VectaFluorTM Duet Double labeling kit* (Vectorlabs) se añadió a los portaobjetos y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Las secciones se lavaron tres veces con TBS-Tween 0,05% y otras tres con TBS. Los núcleos de las células se tiñeron con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (1 µg/ml en TBS; Sigma-Aldrich) durante 5 minutos. Las secciones se lavaron tres veces con TBS y otras tres veces con agua destilada, siendo cada uno de los lavados de 5 min. Posteriormente se dejaron secar durante 30 min a 37 °C y se montaron con medio Mowiol[®] (Sigma-Aldrich). Todas las incubaciones se llevaron a cabo en una cámara húmeda. El control negativo se efectuó sustituyendo el anticuerpo anti-Mpo por suero normal de conejo (1:400; Sigma-Aldrich).

2.9. PCR cuantitativa (con transcriptasa inversa) (RT-qPCR)

El ARN total de riñón anterior, corazón, cerebro, músculo, bazo, intestino anterior, intestino medio, intestino posterior, branquias, páncreas, los glóbulos blancos, el estómago y el hígado se extrajo y el ADNc se sintetizó, con ligeras modificaciones, según lo descrito anteriormente (Fontenla *et al.*, 2016). Resumiendo, se empleó el método del TRI Reagent[®] (Sigma-Aldrich) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN resultante se secó, se disolvió en agua libre de ARNasas y se cuantificó en un espectrofotómetro Nano Drop ND-1000 (NanoDrop Technologies). El ARN total se trató con

ADNasa I (Thermo Scientific) para eliminar la posible contaminación con ADN genómico. La síntesis del ADNc se realizó con 20 ng/ μ L de hexámeros (Nzytech), 0,5 mM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP; Nzytech), 20 U de inhibidor de ribonucleasas (Nzytech), 200 U de transcriptasa reversa (*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 μ g 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.

La amplificación del ADNc se llevó a cabo con la mezcla de reacción para qPCR (Nzytech) y 0,3 μ M de cada cebador específico (QMPOF: 5'-GGCGCCTACACACAGATTTT-3' y QMPOR: 5'-GAGATGCTGGGGTCAACATT-3'). Las mezclas se incubaron durante 5 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de incubación (10 s a 95 °C y 30 s a 60 °C) y un ciclo de disociación consistente en 15 s a 95 °C, 15 s a 55 °C y 15 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). El tamaño y la especificidad de los productos de PCR se comprobaron en un gel de agarosa al 2%. La expresión normalizada del gen de la MPO se determinó por el método CT comparativo (Schmittgen y Livak, 2008), mediante software de acuerdo a las guías de mínima información para la publicación de experimentos de RT-qPCR (Bustin *et al.*, 2009; Bustin y Wittwer,

2017). Según lo descrito anteriormente, el factor de elongación 1-alfa se empleó como gen control para los análisis, debido a que se ha identificado como el más estable de los genes para todos los órganos empleados (Blanco-Abad *et al.*, 2018).

2.10. Expresión de varios genes relacionados con el sistema inmunitario en leucocitos de riñón anterior estimulados

Se recogieron células de riñón anterior de 10 peces tal y como se describió anteriormente y se purificó la mieloperoxidasa de neutrófilos de rodaballo como se describe por Castro *et al.* (2008a). Se dispensaron 250 μ l de suspensión celular en cada pocillo de placas de cultivo de 24 pocillos (IWAKI).

Para la determinación de la expresión de diferentes genes en respuesta a la MPO, se agregaron 250 μ l de mieloperoxidasa de rodaballo (25 μ g/ml o 50 μ g/ml) o medio L-15 a cada pocillo y se incubaron con las células durante 1, 6 y 24 h a 18 °C. Las células también se recogieron después de suspenderlas en medio L-15 (0 h). Después de la incubación, el aislamiento total de ARN, la síntesis de ADNc y la RT-qPCR de las células de cada pocillo se llevaron a cabo como se describió anteriormente.

El par de cebador directo/reverso utilizado en los experimentos se muestra en la Tabla 3.

Genes	Cebador directo (5' → 3')	Cebador reverso (5' → 3')
<i>lox</i>	GTTTGGGAAACGCATCATC	TGCACGTGCTCCTGATAGTC
<i>mmif</i>	GTCATCATGCCGATGTTTGT	CAGGTTTGCCCATTTCTTTG
<i>mpo</i>	GGCGCCTACACACAGATTTT	GAGATGCTGGGGTCAACATT
<i>cd11b</i>	ACGGGGAAAGACACTCTGTG	TCCTGATCCCCTGGTAGC
<i>cd18</i>	TGCTGTATGTGGGGACAAAA	TGTTGTCCATGTGGCACTTT
<i>infy</i>	AGGGCAGTGTGTGTCTGTG	AGTGCAGCAGGAGTTCTGT
<i>tnfa</i>	GAAAACAGATCCCCACTCCA	CACTCCAGCTTGTCTGTGA
<i>il12b</i>	GCACCTGGAAAAGGACAGAG	GAGATGGGGTGTGTTCCTC
<i>mhcii</i>	TCGCTTGTGTCCTCAGTGTC	TGTTGACGAGGTCAGCAAAC
<i>tcr</i>	CATTGAACCGAAGGACGATT	GTTGTGGTCCGGTCTGATCT
<i>il22</i>	ACCGTCCACAGAGATGAAGC	CTGACCCGAGGAAACAGTCT
<i>il17</i>	ACGACGACCTGCGACTTTAC	TGGAGAAGCCTGATGTTGAA
<i>il8</i>	CCATCAGTGAAGGGGTGAGT	GCGTCTTCTGTTGGACATGA

Tabla 3. Cebadores empleados para la RT-qPCR. *lox*: lipoxigenasa; *mmif*: factor inhibidor de migración de macrófagos. *mpo*: mieloperoxidasa; *CD11b*: integrina alfa M. *CD18*: integrina B-2. *tnfa*: factor de necrosis tumoral α . *il12b*: interleucina 12B. *mhcii*: complejo mayor de histocompatibilidad clase ii (cadena α). *tcr*: receptor de células t (cadena α). *il22*: interleucina 22. *il17*: interleucina 17. *il8*: interleucina 8.

3. Resultados

3.1. Gen completo

La estructura del gen que codifica para la MPO del rodaballo fue dilucidada por la amplificación del ADN con cebadores específicos, generando fragmentos superpuestos en todo el gen. Finalmente, la secuencia de ADNc de la mieloperoxidasa se alineó

con la secuencia del gen cromosómico (número de acceso CP026258.1) de la base de datos GenBank (NCBI), encontrando que ambas secuencias coincidían en un 99,58%. El gen de la mieloperoxidasa de rodaballo presenta 5690 pb y contiene 14 exones. Además de los 13 intrones del marco abierto de lectura (ORF), hay un intrón de 134 nucleótidos ubicado en la región no codificante 5' (5'UTR) (Fig. 1). Las regiones no codificantes 5' y 3' tienen 111 pb y 970 pb, respectivamente. La secuencia codificante contiene 2301 nucleótidos que codifican un polipéptido de 767 aminoácidos con una masa molecular esperada de 86,21 kDa (Figs. 2 y 3).

```

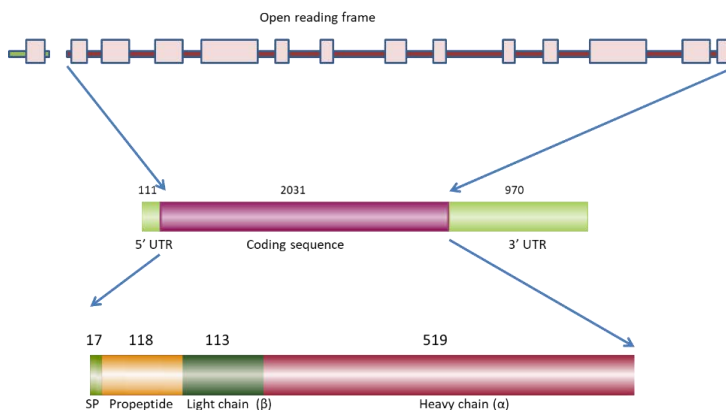
CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGGAACACTCGCATCACAAC
TCAGCTCTCCAGCTTCACCGAAAACTCGCAGACACTGCTAATGAGATTTTCCTTTTTTGGGGGGT
ACAGGGACACAATGGAAATTTGATCTTACACAGTGCTATTTCTTTGCATGCCTTTTGACTTTTAAATTT
TTATCTGACTTTGATTTGATCATTGTTTCAAGATGCTTTTCTCTGTCTTCTTGTGCTGGGCCTCGG
CCTGGTGCCGCTCACTCCGTACCAACAGTAGGCTGCATCCTTCATACTAAAGACATGATCCTAATTCA
CGTTTATATGCCTTTGTATCACTTTTAAATTTCCAATTCCTTTGATAAATGTGTTGTTGGGTTTTTTT
GCAGGAGAACATCTCGGCAGCTCTCTCCTTCAAAACTGTTTTGAGCAGGCAAAGAAAATTTGTGGACGATG
CATATTTTTACTCCAGAGCAGAGTTCATATCATTTTTTCTGTCAATTAATTATACAGCACACATATATTC
TGAAGGACAATTTCATAGGCAAGTCATTCATTACAATCTTTTTGCACCCAGTAATTTGAAGAAAAGTT
AGAGAACCTCTGAGCAGGAAAACAGTTTGGACTCGATTGTTCAATAGTAGGACTTTTTACCCTCAGGAG
TCTGAGGCGAGTCCGCAAGGAGGTGGTGAGGCCTCACGATGCTCTCCGCTCCTGAAGCAACCCGGGGT
GAAACGCGCTCAGCCGTGAGATCTGCGGACTACATGGCTCAAACCTCCGTCTGCTGCAGGAGAGGGTGC
ATCATCGGCACAAGCGCTCACTCAACGCAACAGGTCAGACAAGGCAGCACACAGTGTGACTCTGTTTGA
GAGACAGCTTGTGCTGGTTTTGATCGAGGCTTTGAGATCTGCCGTTTCATAATATGGTCATAGTGGAGCA
CTTTACAAAGCTGTCATTGAGATACAGACAAGTCAGGTTGGCAGACAAGCACACGCACCTGTGAGTACATG
AAATGTGCTTTTCGCATTTTTTCAGATCTGCTCAGTGAAGAAGACCTGACAAATCTTTCCAAGATAACTGG
ATGTGCAGCTCGAGTCAGAGTCCCAGAATGCCGCACCACAGCAAATGTCAACAAGTATCGCAGGATCACC
AGCCTCTGCAACAACCTGTAAGAAACTTTAAGCAACAGGTTTTGCTTTCCACATCATCATCTTTTAGTCG
CATGTAAAAATACTATGAAACCTAAATTTCAAGTAAGCAGACACATTTGGAGTTGGTTTCCATTTTTGA
CTTATTGCTTCCCAGGATAAGTTTTCCCCGGTACTGTTTGTGGTTTCTGTGAAAAACAATTTTTGTT
GTTGAATAAATGAAACGCAGCAGGAAGCAGTTGATTTATTTAACAGATTCAGTGGTGCATATATATG
AAGAGGACATGCTTGTGAAACGCAGCTGAACATCTTGGCCATACACCACAGAAGATGTGTACTCTCTG

```

TGGGATTTCTCAAGCATGCGTTTCCACACATGGACGTTTCTTGTTCCTTTTAGAAAAACCCCTCGCCT
 CGGAGCCTCCAACACCCCTTCAGCCGCTTGCTGCCTGCTGAATACGACGACGGCATCTCCAACCAAAA
 GGCTGGAACAACCGAACATTGAACAACCTTCTTACTCCACTGTACTGACTTCGAAAAATCCAGATAACT
 CACCCTGATGTTGACACGCGTAAAAGTTTTATTCAAAATGGAAACATGTCCCCACTCTCAGGTGCGACA
 GGTGTCCAACAACATCCTGAACACAACAGATGCCGCCGTGGTCAGCGACAGAGAATCACTCACATGGTG
 ACCTTGTTTGGCCAGTGAATGACCACGATCTCACCTTCACGCCCTTCTCCCCAGCATCCGCTCCTTCA
 GCAACGGGGTGAAGTGCAGCAGAGCTGTGAGAAAACAGCCATGCATCCCCATCCCGGTTGGTGTCAA
 ACCCAAACCAATGTCTTCATCAGTTCAACAGTTCCTTTCATGTGACATGACCTTTAACCTCCGCTGCA
 TTCAAACAGATTCTCCCGGCGACCCTCGTCTGCCCTCCCGCCAGACAGCTGCATCCCTGCGTTCAGAT
 CGGCCCGGCTTGTGGAACAGGATACTCGCCCTACAATTTCCGCGGAGAGCCCAACAGAGAGAGCAGAT
 CAACGCTCTGACAGCCTTCTGGACCTCAGCCAGGTGTACGGCTCTGAGGAGAAGCTCGCCCTCAACCTT
 CGCAACCTCAGTAACGACGGCGGCTGCTGCGCGTGAATACTGAGTTCAACGACAACGGGCGTGAGCTGC
 TGCCCTCAGTACCCTCCAGGCCAGATGTGTGCCACTCGCAAAGAGTCACCAATGATACAAATGCCAA
 GGAGGTGCCCTGTTTCATGTCAGTAAGTCATGTTTCAGGATTCAAGAACTTTATTGTGTTTCATGACATTT
 TAATCAAGCCAACATTTACACGACATGGTACCAAACATGTGAATCTGAAGAGAAAACGAACGCTTTTTTA
 TGGTTTCTGCAATTTCTGCCTTGAAGGTGATGTGCGCGTGGACGAGAACGTCGCTCTGACGTCAATTCAC
 ACCTTGTTTATGCGCGAGCACAAACCGCTGGCCAGAGCCTGAAGAGACTGAACCCACACTGGGACAGTG
 AGACACTCTACCAGGAGTCCCGCAAGATCATGGGCGCCTACACACAGGTAGTGGATCAACATTTCTCACGT
 GTACCTTCACACCTCCAACACGCGTGTGTGTCATACACTCAACATACATGTCTCTGCTCGCTCAGATTT
 TTGTGTTCAGGGACTATCTGCCGCACATTTGGGTGACAACGCGGTGCGGACACAGATAGGCCCTTACTC
 CGGCTACAATCCAATGTGACCCAGCATCTCAACGCTTTCGCAACAGCAGCTTACCCTTCGCCCCAC
 TTGGCCATCCAGCCATTTCTATTCGCCCTGGATGCAAACTACAGGGAGAATAATCGGTTCCCCAGTGTGT
 CCCTGTACAGGCCTTCTTCACGCCCTGGAGAATCGTCTTCGAGGGTGAGCGGTACAGAGAAAAACTCC
 ACCGTTTCGATGATTGCGTCTTAAAAACATCAACCTAATTTGAATTTGATCTCTCCAGCGCGGCTTGACTCT
 CTGCTGCGTGTGTTGATTGGCCGTCCTGCCAACTGAACACTCAGGATCACATGATGGTGGACGCTCTGA
 GGGAACGGCTCTTCCAGTTTGTGACGATCTGGCTTTGGACCTGGGCTCTCTCAACATGCAGAGGGGACG
 TGACCATGGCTTGCCCTGTACATCAGTCACCCTGATTCACCTTTTTTTTTTAATGTTCTTTCTAATGTTT
 CATCTTTGTCTTAATTGCACTCTTTGTTTGCTTGTGCTTTACTCCTCCAGGCTACAACGCCTACCGCAGG
 GTGTGTGGCTGTCTCAGCCCCGAACAGCGGAGCTCGGTGGGTTCTGAACAACAACAATCTGGCCC
 GAAGGCTGCTGCAGCTCTACGGTTCGCCGACAACATCGATGTCTGGATGGGAGGTGTGGCGAACCGTT
 TGTCAGGGCGCGGAGTGGGACCTCTGTTGCTGTCTCATCGGAAGACAGTTCAGAGGATCCGCCAG
 GGTGCACAGGTGAGTATGTGTGTGGATACAGTACAATCTTAGTGTGTGTGTGGCCCTGCATCGG
 TGCAGCCCGAGTCTTATGTTGAACATTACAATAATATATGTTCTTAATATATGAAGTATTTAGCCTCCT
 AAAACACACAAGGAGGCATGGTACTTAATTTGTAGAAGTGTGTTGCTTGAAGCAGCAACAACCTGTGGTC
 CTCTACAGAACAATGACATGCTCTAACTTTGCCTTTGATAACTACTGTATTTGTTCCACTTTGGAACCTA
 ATTATAAACTCAAGAAATGAAGTATTATCCAGTAGCCTGAGATTTGTGGCTTTATACCAATGTGAAT
 GCACGACTTTGGTGACAACCTTTTCATCTCGTCTGTTTGAATTCACAGGCTGTGGCATGAGAAGCCCG

CGTCTTACCAGGAGACAGAAAGCTGCTCTGTCTCCGCCACCTTGTC AAGATCATCTGTGACAACACT
GGCATCACGTCTGTCCGCATAACGCCTTCAACGTCATCTCAGGCAAGAACCGGCTCGTCCGCTGCAACA
ACATCCGAGCGTGGACCTGACGGCGTGGAGGGAGAGAATCTGCTCGGACAACCTCAGGCCCCAGTGATAG
CTGTAATGAAGTCAATGGAACAGAGGTCGGTTTTCAAGCACTAACAAACAACCTAGTCACATTTAGCACACC
TTGAATCAACATTTGTTCTTAACTTTTTGACATCACTTGGTGAGGTGGTAATAATAACTCCAAAAGTAAC
AACTCACGGTTTTACTCATCAAGCATGTTATTAAAAAAGATTCCCTTCAATTATGAGACTGAATATGTTCA
ACTTCTACATGTTCTCGATACACAGAAATGTGACCCAGTTGAGCCCTCAGCACCAGCAGAGTCTCCAGGAC
AACGAGGTAAGCCGATCAGTTTCTACTGTACACTGTGATATGTTGCATGTTTTGACAGAAGTTGCAAGTA
TTATGATCTTGTGTTTTCTCTCCAGGTCAGTAGGACCTCAAGGTCCACGAGGCCGTCGAGGTCGAAGAGG
TCATCGGGGTCACCCAGGTCCAAGAGGCCCTCCTGGTCCACCATCATCCCCAGCAATGCCACACAACCA
CAATCGGCCTTCTCTGTCTCTTTGGGCGAGTACAAACAATCTGTAGAAAGAATAATTCATTTCCACCAGG
TCATCTACAATGACCAGAACCTACAGCAGCGACAGCGGCTTGTTCACCTGTGTCTCCCCGGTGTCTA
TCAGTTCAGCTTTCTGTGCACGTCCTTTCATCGGTGCTGGAGGTGTGGACCTGTGGCTTAACAGTAAGCTG
GTGCTGCAAGGTTTCCGGGTCAATCAGGGAGGTCACAACCTTGTGCTCAGGGGACACACTTCTCCGGCTGA
AGACAGGAGACAAAGTTTGGCTGGAGGCCGGCAACGGGACCGTCCGGCTGAGCACCAGGAGCTTCTTCTC
AGGCCGCTGCTCTCCCTTTGTGACACAAACACTTCTGACTGAAATGTCGCCCATCGAATTACAAATGA
CGACCGTCTGCTTTAGAATATGTTTTCAATTCTCACCTCTCTACACTGAAATATAGGACTCTATATTA
CTATTATTATCCTCTTAACCAATGGACCAGACTAGACCATACAACTGTACACATGTTACTGAAAGATTCA
CACGTACAATTGTTTTAGTTATTAGCTTAATGTGATTGCAGCAAACATTCGTGAAATTTTCTTACAGCGT
GCAATTGATTGGACCGAAATTTTTGTGTCAGTAAGCATTCTTTGAAGGAAGGAATTACCAGTATTATTAT
GAATATTTTATGCACTGATGAAATGTAGGTGTGCCTTGAAAATGTTGTGCTTTTTCTGGTCCGTTTGT
GACGTTTCCGTAACCTTCTACCTTTTGTATTTTGCATTAAATAAAAGCTAAGTGTGCTGAGCTACAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Fig. 1. Secuencia de nucleótidos completa del gen de la mieloperoxidasa de rodaballo. Los intrones aparecen en gris. Los codones de iniciación (ATG) y de terminación (TAG) se indican en negra.




```

tggagaatcgtcttcgagggcggttgactctctgctgctggttggattggccgctct
W R I V F E G G V D S L L R G L I G R P
gccaaactgaacactcaggatcacatgatggggagcgtctgagggaaacggctctccag
A K L N T Q D H M M V D A L R E R L F Q
tttgtgcagcatctggctttggacctgggctctctcaacatgcagaggggacgtgaccat
F V Q H L A L D L G S L N M Q R G R D H
ggcttgctggctacaacgcctaccgcaggggtgtggtgctgctcagcccgggaaccag
G L P G Y N A Y R R V C G L S Q P R N Q
gcggaactcggctcgggttctgaacaacaacaatctggcccgaaggctgctgcagctctac
A E L G R V L N N N N L A R R L L Q L Y
ggttcgcccgaacaacatcgatgtctggatgggaggtgtggcggaaccggtttgtccagggc
G S P D N I D V W M G G V A E P F V Q G
ggccgagtgaggacctctgtttgctgtctcatcggaagacagttccagaggatccggccag
G R V G P L F A C L I G R Q F Q R I R Q
ggtgacagggctgtggcatgagaagcccggcgtcttcaccaggagacagaaagctgctctg
G D R L W H E K P G V F T R R Q K A A L
tcctcgccacctgtccaagatcatctgtgacaacactggcatcacgtctgtcccgcacat
S S A T L S K I I C D N T G I T S V P H
aacgcttcaacgtcatctcaggcaagaaccggctcgtccgctgcaacaacatccgagggc
N A F N V I S G K N R L V R C N N I R G
gtggacctgacggcggtggaggagagaatctgctcggacaactcaggcccagctgatagc
V D L T A W R E R I C S D N S G P S D S
tgtaatgaagtcaatggaacagagaatgtgacccagttgagccctcagcaccagcagagct
C N E V N G T E N V T Q L S P Q H Q Q S
ctccaggacaacgaggtccagtag
L Q D N E V Q -
gacctcaaggtccacgagggcgtcgaggtcgaagaggtcatcggggtcaccagggtccaa
gaggccctcctggtccaccatcatcaccagcaatgcccacacaaccaatcgggctctct
ctgtcctcttggggcagtagacaacaatctgtagaagaataatcatttccaccagggtca
tctacaatgaccagaaccaactacagcagcagagcgggcttggtaacctgtgtcgtccccg
gtgtctatcagttcagcttctgtgcaagctcctcatcgggtgctggaggtgtggacctgt
ggcttaacagtaagctgggtgctgcaaggtttccgggtcaatcaggggaggtcacaactgtg
cgtcaggggacacacttctcggctgaagacaggagacaaagtttggctggaggccggca
acgggacgctcggcctgagcaccaggagcttctctcaggccgctgctcttccctttgt
gacacaaacacttctgactgaaatgtgcccacatgaattacaatgacgacgctgtgctt
tagaatgttttcaattctcaccctctcacaactgaaatattaggactctatattacta
ttattatcctcttaaccaatggaccagactagaccatacaactgtacacatgttactgaa
agattcacacgtacaattgttttagttattagcttaattgtgattgcagcaaacattcgtg
aaattttctacagcgtgcaattgattggaccgaaatttttggctgagcaatgacattctttt
gaaggaaaggaattaccagttattattgaaatattttatgcaactgatgaaatgtagggtgtg
ccttgaatgtgtgctttttctggctgggtttgtttgacgtttgcgtaactttctctac
ctttgtattttgcatataaaagctaaagtgtgctgagctacaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaa

```

Fig. 3. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la mieloperoxidasa de rodaballo. Los sitios de glicosilación potencial están subrayados, al igual que la secuencia señal de poliadenilación (AATAAA) en la región no codificante 3'.

El análisis de BLASTp reveló que esta Mpo de rodaballo presenta una mayor similitud con la peroxidasa de eosinófilos, tanto en mamíferos como en peces, que con la mieloperoxidasa. La Mpo de rodaballo posee un porcentaje de identidad que varía entre el 47 y

87% con otras especies de peces, está alrededor del 50% con mamíferos y es del 46-48% con reptiles y anfibios (Tabla 4).

Como se observa en la tabla de identidad (Tabla 4) y en el árbol filogenético (Fig. 4), en el grupo de los peces, la similitud va aumentando progresivamente a medida que avanzamos en la escala evolutiva, alcanzándose el valor máximo con el fletán *Paralichthys olivaceus* (dentro de las secuencias que aparecen en el GenBank) que pertenece al mismo orden que el rodaballo (Pleuronectiformes).

Species	Accession number	Defenition	Identity	E-value
Japanese flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	XP019938120.1	Eosinophil peroxidase-like isoform X1	87.09%	0.0
Greater amberjack (<i>Seriola dumerili</i>)	XP022617957.1	Eosinophil peroxidase-like isoform X1	84.63%	0.0
Indian medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	XP024155569.1	Eosinophil peroxidase-like	79.86%	0.0
Fugu (<i>Takifugu rubripes</i>)	XP003965561.3	Eosinophil peroxidase-like	77.96%	0.0
Atlantic cod (<i>Gadus morhua</i>)	XP030210984.1	Eosinophil peroxidase-like isoform X1	72.29%	0.0
Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	XP021446773.1	Eosinophil peroxidase-like	70.94%	0.0
Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	XP021472524.1	Myeloperoxidase-like	69.15%	0.0
Goldfish (<i>Carassius auratus</i>)	XP026075235.1	Eosinophil peroxidase-like isoform X2	66.39%	0.0
Goldfish (<i>Carassius auratus</i>)	XP026075237.1	Myeloperoxidase-like	64.18%	0.0
Asian arowana (<i>Scleropages formosus</i>)	XP029109073.1	Eosinophil peroxidase-like isoform X1	61.95%	0.0
Asian arowana (<i>Scleropages formosus</i>)	XP018604498.2	Myeloperoxidase-like isoform X2	58.43%	0.0
Whale shark (<i>Rhincodon typus</i>)	XP020382168.1	Eosinophil peroxidase-like	52.90%	0.0
Whale shark (<i>Rhincodon typus</i>)	XP020382156.1	Myeloperoxidase-like	52.20%	0.0
Human (<i>Homo sapiens</i>)	NP000493.1	Eosinophil peroxidase preprotein	51.14%	0.0
House mouse (<i>Mus musculus</i>)	NP031972.2	Eosinophil peroxidase preprotein	50.63%	0.0
Coelacanth (<i>Latimeria chalumnae</i>)	XP005992326.1	Myeloperoxidase-like	50.41%	0.0
Coelacanth (<i>Latimeria chalumnae</i>)	XP014349544.1	Eosinophil peroxidase	50.29%	0.0
House mouse (<i>Mus musculus</i>)	NP034954.2	Myeloperoxidase precursor	49.93%	0.0
Human (<i>Homo sapiens</i>)	NP000241.1	Myeloperoxidase precursor	49.86%	0.0
Chicken (<i>Gallus gallus</i>)	XP015151416.1	Eosinophil peroxidase isoform X3	48.87%	0.0
Common wall lizard (<i>Podarcis muralis</i>)	XP028564555.1	Myeloperoxidase-like	48.59%	0.0
Common wall lizard (<i>Podarcis muralis</i>)	XP028592557.1	Eosinophil peroxidase-like isoform X1	47.89%	0.0
Sterlet (<i>Acipenser ruthenus</i>)	RXNM30026.1	Eosinophil peroxidase	47.55%	0.0
African clawed frog (<i>Xenopus laevis</i>)	NP001081108.1	Myeloperoxidase precursor	47.26%	0.0
Chicken (<i>Gallus gallus</i>)	XP015151399.1	Myeloperoxidase	46.88%	0.0
African clawed frog (<i>Xenopus laevis</i>)	NP001081848.1	Eosinophil peroxidase precursor	46.23%	0.0

Tabla 4. Identidad aminoacídica de la mieloperoxidasa de rodaballo con peces y otros vertebrados, ordenadas de acuerdo a la identidad (%) y al valor-E (E-value).

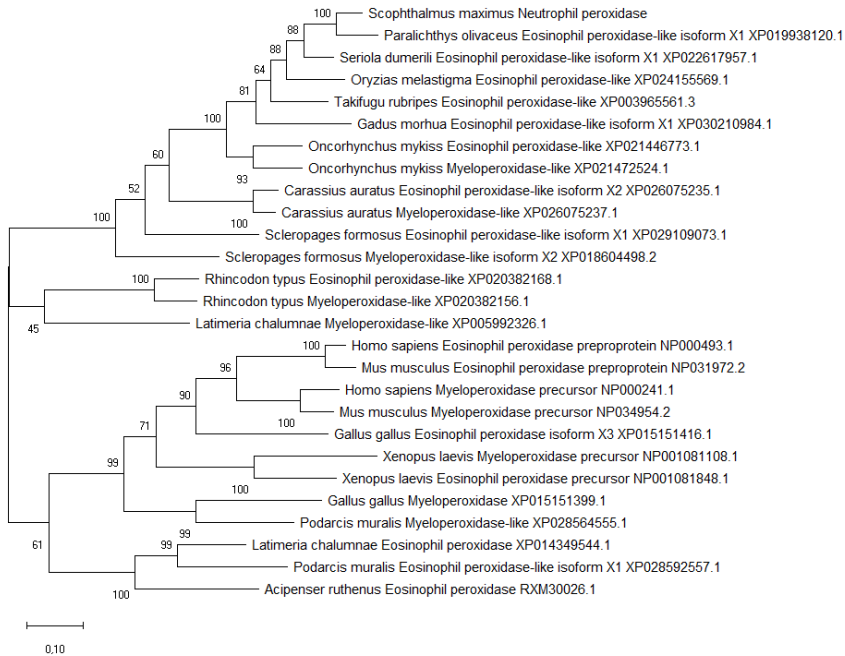


Fig. 4. Árbol filogenético de la Mpo de rodaballo y otras especies obtenido usando MEGA X con el método de máxima verosimilitud. El árbol se dibuja a escala, con longitudes de rama medidas en número de sustituciones por sitio. El análisis incluyó 25 secuencias de aminoácidos. Se eliminaron todas las posiciones en blanco o perdidas. Los números de acceso del GenBank de cada secuencia se indican después del nombre de la especie y el nombre de la peroxidasa.

La alineación con ClustalW de la secuencia de la Mpo de rodaballo con el gen homólogo en otros vertebrados mostró varios dominios conservados, tales como el péptido señal, el propéptido y las cadenas ligeras y pesadas (Figs. 5 y 6). Los dominios de propéptido, cadena ligera (cadena β) y cadena pesada (cadena α) contienen 118,

113 y 591 aminoácidos, respectivamente. Otros sitios importantes para la regulación de la actividad mieloperoxidasa también están presentes en la molécula de rodaballo: la cavidad del hemo distal I en los residuos 195-245 (PLVRQVSNNILNTTDAAVVSDREFTHMVTLF GQWNDHDLTFTPFSPSIRSF), la cavidad del hemo distal II en los residuos 383-435 (CFIAGDVRVDENVALTSIHITLFMREHNRLAQ SLKRLNPHWDSETLYQESRKIM), la cavidad del hemo proximal I en los residuos 453-499 (GDNAVVRTQIGPYSGYNPNVDPSISNVFA TAAAYRFAHLAIQPFLFRLD) y la cavidad del hemo proximal II en los residuos 539-591 (PAKLNTQDHMMVDALRERLFQFVQHLAL DLGSLNMQRGRDHGLPGYNAYRRVC) (Figs. 5 y 6).

Asimismo, también se identificaron residuos catalíticos (Gln-227, His-231, Arg-390, His-488 y Asn-573), residuos de enlaces hemo (Asp-230 y Glu-393), residuos de cisteína en las posiciones 135, 151, 251, 255, 261, 280, 290, 366, 383, 592, 649, 690, 715, 731 y 741, y sitios de unión a Ca^{+2} en los residuos 312-319 (LTAFLDLS) (Figs. 5 y 6). Ocho sitios potenciales de N-glicosilación están presentes en las posiciones 107 (NATD), 119 (NLSK), 186 (NRTL), 206 (NTTD), 334 (NLSN), 374 (NDTN), 745 (NGTE) y 749 (NVTQ) (Fig. 3).

Scleropages formosus	-----MKAVVAVMAA-WLFLATSRQSAAGESLG	27
Scophthalmus maximus	-----MLFSVLLVLGLGLVP-AH--SVPTGEHLG	26
Ictalurus punctatus	-----MNLTSVSV-LGLCCTVSAQTVSGSEKGLI	29
Carassius auratus	-----MDLHTFLFLVACCCALS----LGAEESPG	26
Danio rerio	-----MNLPTFLFVVGCCALS----VGAEESPG	26
Xenopus laevis	-----MTSLYISFGFLILGL--VPVLSLSFYDGVVELD	32
Homo sapiens	MGVPPFSSLRCMVDLGPWCWAGGLTAEMKLLLAGLLAILAT--PQPSEGAAPAVLGEVD	58
Mus musculus	-----MKLLLAGLLAPLAM--LQTSNGATPALLGEVE	32
Podarcis muralis	-----	0
Gallus gallus	-----	0
Scleropages formosus	RPFILSSVEEAKRIVDEAYKYSRERTLQVNS-NTASHSDILRLLKQPSRDARSVAVRSAE	86
Scophthalmus maximus	<u>SSLQNCPEQAKKIVDDAYFYRAESLRRVRK-EVVRPHDALRLLKQPRGETRSVAVRSAE</u>	85

FRANCISCO FONTENLA IGLESIAS

Ictalurus punctatus RFFILDAIQEAKRLVDDSYLYSRRTSLERVKNDYIKPSDVLRLMKQPKRKAREAVRAAD 89
 Carassius auratus RRFILDSFEAAKIVDAAYKYSRDESARVRR-DVIKPSDKLRLKQPAKTRAVRAAD 85
 Danio rerio RFFILDSIEEAKIVDAAYKYSRDESARVRK-DVIKPSDKLRLKQPAKTRAVRAAD 85
 Xenopus laevis NDIILNSVQEAQKILVDAAYKRRTRDVLKARLKQ-KDVRPSPDMVAFKQPVASTRHTRAAAD 91
 Homo sapiens TSLVLSMEEAQKLVDAAYKERRRESIKQLRS-GSASPELTSYFKQPVAATRTAVRAAD 117
 Mus musculus NSVVLSCMEEAQKLVDRAYKERRESIKRSLQS-GSASPELTFYFKQPVAATRTAVRAAD 91
 Podarcis muralis -----MPLGAKENLRN-PHLTPSDFLRHLKEPVAGTRTAIRAAS 38
 Gallus gallus ----- 0

Scleropages formosus YTETTLRLIKEKTHHAYKSSINATDMLSPEMDTIARLTGAKARILPPSRTIIMLSQYH 146
Scopthalmus maximus YMAQTLRLLOERVHHRKRSLNATDLLSEEDLTNLSKITCAARVRVPE**RTTANVNKYR** 145
 Ictalurus punctatus YLEQTLRIISEKTHHAKRSINATALLSHEELRTIEDVTGAGQTLPPPCRTLPDLNRYR 149
 Carassius auratus YMVQTLRLISEKAHVHAKRSINATNLLTQDELNTIQHLTGTAQTRPPS**RTTPLINKYR** 145
 Danio rerio YMAQTLRLISEKAHVHAKRSINATNLLTQDELQITRMTGTAQTRPPS**RTTPLINKYR** 145
 Xenopus laevis YMGTTLELSEKVVQSVYSRFPNITDVLITANQLDITIKVYSGAFHLHQRP---P-NTPYR 147
 Homo sapiens YLHVALLLERKRLSLWRFPNITDVLITPAQLNVLKSSSGAYQDVGVTP---PEQDKYR 174
 Mus musculus YLHVALLDLKRLKQLWPRFPNITDVLITPAQLNLLSVSSGAYQDVGVTP---PPNDKYR 148
 Podarcis muralis YMETALLRQKQLKQVWHRFPNITDVLISIQKDMITRATGTDYILIRPVTR---PQNSPYR 95
 Gallus gallus -----MRFNITDLLDRKQKEMISKETGVDYQIRSIK---PEDDTYR 39
 : * * * : : : * * * * *

Scleropages formosus TATGILNNLKNFRLGASNMPFVRWLPQAQYEDGISQPLGNDTKKHQNGFLLPLVREVSNI 206
Scopthalmus maximus **TITSLNNLKNFRLGASNTPFRRLLPAEYDDGISQPKGWNRTL-NNFLLPLVRQVSNNI** 204
 Ictalurus punctatus TANSVNNHINPLQGASNTAFTRWLPVYVEDNVSEPRGWNPERLYNGAALLPLVRLVSNRI 209
 Carassius auratus TIANVNNRRNPLLGASNTAFTRWLPQAQYEDGISQPKGWDPKMHNGALLPLVRLVSNRI 205
 Danio rerio TASGVNNRKNPLLGASNTFPARWLPQAQYEDAVSQPKGWDPNKLYNGAALLPMVRLVSNRI 205
 Xenopus laevis SFTGENNRRFPNFVGSNRPYTRLLPAQYEDSRSLPKGWTNRRRINGFMLPLARAVSNQI 207
 Homo sapiens TITGMNNRRSPTLGASNRAEVRWLPQAQYEDGVSPLPGWTPGVKRNRFVVALARAVSNEI 234
 Mus musculus TITGHNRRSPTLGASNRAEVRWLPQAQYEDGVSMPFGWTPGVNRNGFKVPLARVSNAI 208
 Podarcis muralis TITGENNRRKHPFGMSNHGYARWLPQAQYEDGVS LPKGLIQGLYHGHPPLVLRQVSNIE 155
 Gallus gallus TITGENNRRKEPHLGVSNHAFARWLPQAQYEDGVSVRGASEGKLYNAPFLVLRVKSNEI 99
 : * * * * * : : : * * * * *

Distal Heme Cavity I

Scleropages formosus LRTANKDVENDIQYSHLVTFMGQVNHDLTFTPPSSPSIRSFNSNGINLAQSERBNPFFPM 266
Scopthalmus maximus **LNTTDAAVVSDFRTHMVLTFMGQVNHDLTFTFPFSPSIRSFNSNGVNDSESEKTEPPIPI** 264
 Ictalurus punctatus FSTQDQNVQGDTEYLLTITFGQVNHDLSTFPFSPSIRSFNSNGINLDDSERSEPFPI 269
 Carassius auratus LSTADSDIESDFRTHMVLTFMGQVNHDLTFTFPFSPSIRSFNSGLDDQSERSEPFPI 265
 Danio rerio LATADADIESDHDFTFMLTIFGQVNHDLTFTFPFSPSIRSFNSGIDCESERSEPFPI 265
 Xenopus laevis LRFPFERQTLDNQRSLMFMQWQVNHDLDLAPETPARSFLKGIODHSARLPLPFPL 267
 Homo sapiens VRFPDQLTPQERSLMFMQWQVNHDLTPEPARASVTVGVNSETSIVQQPPFPL 294
 Mus musculus VRFENQTLTKQERALMFMQWQVNHDLITLPEPARFRSFTGLNSETSIVQQPPFPL 268
 Podarcis muralis IGTNPKITDQERSLAFMHQWQVNHDMDLAPMTETSINQQVHSDTSSNYTTPPFPI 214
 Gallus gallus AHTANENIQDQELSLEFMMQWQVNHDLIDLAPSSGMG--ANPELHDADITFRSPFPI 157
 * : : : * * * * * : : : * * * * *

Scleropages formosus KIPPNDPRFKDKPQVKLPTFRSAPSGTGGGYMFGAV-NVRQOMNTLAPLIVGQVYG 325
Scopthalmus maximus **PIPPGDPRLPSRPD-SLTPAFRSAPAGTCYSAYNFGGEPNKRQINATLAPLIVGQVYG** 323
 Ictalurus punctatus QIPRSDPRLPLRSN-SLTPVFRSAPAGSGNSPYMFGGVPRLREQINTLQYLAGQLYG 328
 Carassius auratus PAPPGDPRLL--KPG-TLTPVFRSAPAGSGNTAYMFGGPNVVRQINSLQYLAGQVYG 322
 Danio rerio SAPPGDQRL--RPN-TLTPVFRSAPAGSGHTAYMFGGVPNVVRQINTLQYLAGQVYG 322
 Xenopus laevis RIPPNDPRIQNR--SDLTPFRSAPAGMGP-----VLEQINVLQYLAGQVYG 315
 Homo sapiens KIPPNDPRIKNQ--ADLTPFRSAPAGSGN-----ITIRNQINAVLSVLAGQVYG 344
 Mus musculus KIPPNDPRIKNQ--KDLTPFRSAPAGTRNN-----ITIRNQINAVLSVLAGQVYG 318
 Podarcis muralis KIPPGDPRIKPK--GVMPFIRTTPTVNPPT-----PIRQLNSLQYLAGQVYG 263
 Gallus gallus KFPDPDFRMLRS--NSMPFIQSASVNPRT-----PTREQINAVLSVLAGQVYG 206
 * * * * * : * * * * * : : * * * * * : : * * * * *

Scleropages formosus SEDALSRNLRDL-TNDGGLLRVNRHFDNGRELLPFVNMTFNTATRQKITGNKSLKEVP 384
Scopthalmus maximus **SEKLAALNLRNL-SNDGGLLRVNTFNDNGRELLPFSTLQACMATAKRVNNTDINAKEVP** 382
 Ictalurus punctatus SEEGLAHELRLD-TDGGLLMRINDRFRDNGRELLPFTKVPKMATRNRI LNTTGLEEVP 387
 Carassius auratus SEDGLAKELRLD-TNDGGLLRVNNKFLDNGRELLPFTNVESKMATRQKITLNDTITTEVP 381
 Danio rerio SEDGLAKELRLD-TNDGGLLRVNNRKFNDNGRELLPFTSVNNTLQYLAGQVYG 381
 Xenopus laevis STNDLARMRLRNNTATQLGLMAVNTRFTDGLLPLPFGTMDKEDFLLTNMS-----SGLP 369
 Homo sapiens SEEPFLARNLRNM-SNQLGLLAVNQRFQDNGRALLPFDNLHDDPMLLTNRS-----ARIP 397
 Mus musculus SEDPLARKLRNL-TNQLGLLAINTRFDQDNGRALLPFDNLHDDPMLLTNRS-----ARIP 371
 Podarcis muralis SEEPLARSIRNQ-SNSLGLMALNQNFDTAGLGLLPPFESNNSIPLYTNRT-----ANIP 316
 Gallus gallus SEESVAKSLRNQ-TNQLGLMAVNQNFDTAGLELLPFPENKTSVPLTNKS-----TNP 259
 * : : * * * : : * * * * * : : * * * * *

Distal Heme Cavity II

Scleropages formosus **SLAGDLRVNDNTGLTSLHTLMLREHNRLARVLHQLNPHWESERLYQEARKIMVAYHQVI** 444
Scopthalmus maximus **FIAGDVRVNDNVALTSIHTLFMREHNRLAQSLKRLNPHWSETLYQESRKIMGAYTOIF** 442
 Ictalurus punctatus **FIAGDERVNDNIALTSMHTLFLREHNRLARALRRLNPNWSEQLYQEARKIVGAYLQNI** 447
 Carassius auratus **FIAGDIRVNDNIALTSVHTLFFVREHNRLARALHVLNPTWSETLYQEARKIVGAYNQIL** 441
 Danio rerio **FIAGDARVNDNAPALNSHTLFFVREHNRLARALHVLNPTWSETLYQEARKIVGAYNQIL** 441

Xenopus laevis	FLAGDARVSSQPGLTAFHTIFVREHNRIARELRRLNPTGEVLFQEARKIVGAIEQKI	429
Homo sapiens	FLAGDRSSMPELTSMSHTLLREHNRLATELKLNSLNRFDWGERLYQEARKIVGAMVQII	457
Mus musculus	FLAGDMRSMPELTSMSHTLFVREHNRLATQKLRNLNFRWNGEKLYQEARKIVGAMVQII	431
Podarcis muralis	FNAGDKRVTLNLGLTALHTLFVREHNRLARELKLVLNPHWDGKELYQEARKIIGAVNQVI	376
Gallus gallus	FRAGDKRVTLNLGLSALHTVFLREHNRLVTKLGLKNLPHWDGKELYQESRNIITAMTQII	319

Proximal Heme Cavity I

Scleropages formosus	TFRNLYKLIVGPKHMHKLGKYPGYNKNVDPSSINVFATAAYRFAHLTVQPIIFRLDNY	504
Scophthalmus maximus	VFRDYLPHILGDNVAVRTQIGPYSGYNPNVDPSSINVFATAAYRFAHLAIQPFILFRDNY	502
Ictalurus punctatus	VFKDYLPHVIGTDAMNKQLGKYPGYNPNIDPTISNVFATAAYRFAHATIQQVIFRLDENF	507
Carassius auratus	VFKEYLPHIVGPDVYNRQLGQYPGYDENVDPTIANVFATAAYRFAHLAIQPIIFRLDNY	501
Danio rerio	VIKEYLPLIVGPDAYNRHLGYPGYENVDPTIANVFATAAYRFAHLTIQPFIFRLDENY	501
Xenopus laevis	NYKDYLPDLLGS-TMTRVLPVRYTSYNDVSNVPGAANVFS-LIFRMGHTMIQPFYIRLVGDY	487
Xenopus laevis	TYRDYLPVLVGPAMTKYLPYRSYNDVDPRIANVFT-NAFRYCHTLIQPFMFRLLDNY	516
Mus musculus	TYRDYLPVLVGPAAKKYLPQYRSYNDVDPRIANVFT-NAFRYCHTLIQPFMFRLLNQY	490
Podarcis muralis	TYRDYLPVLVGN-EMNKQPLLYKGYNDESDPTVSNVFS-LAFRFCHGSVFPVFRLLDQNF	434
Gallus gallus	TYRDYLPDLLAE-ETSKWIPLYSGYHETVDPVSNVFS-LAFRFCHTSVQPFVFRLLDSSF	377

Scleropages formosus	NEHPSFRSVMHLNHTFFAPWRIFEGGVDPMRGLIGRPAKLNSQKHMMDLRELRFFFS	564
Scophthalmus maximus	RENNRFPVSVLYRAFFTPWRIVFEGGVDLSRLRIGRPAKLNTQDHMMVDALRELRFFQV	562
Ictalurus punctatus	QENRQFPPTVLYEAFPTWRIFEGGIDPQIRGLISRPAKLNQDGMVDVAVRERLFAFN	567
Carassius auratus	QNHFPKFPVPLFEAFFSPWRVIFEGGIDPLRGLRIGRPAKLNTQDHMMVVALRERLFAFT	561
Danio rerio	KNHFPQFVPLFEAFFSPWRVIFEGGIDPVLRLRIGRPAKLNTQDHMLVVALRERLFAFT	561
Xenopus laevis	RTSASLPPPIHLLTFNTWRVILEGGVDPLRGLMGNAKLNQDQIIVLDELREHLFLFQV	547
Homo sapiens	QPMENPRVPLSRVFFASWRVLEGGIDPLRGLMATPAKLNQDQIIVVDEIRERLFEQV	576
Mus musculus	RPTGPNRVPVLSKVFFASWRVLEGGIDPLRGLMATPAKLNQDQIIVVDEIRERLFEQV	550
Podarcis muralis	KPLVPYSNVLLHLTFASWRIMEGGIDPLRGLLADHAKLMKQNMVVEELQERLFEQL	494
Gallus gallus	QPMGSLPHVPLHLTFCASWRIMEGGIDPLRGMVVDHAKLMKQNMVVEELQERLFEQT	437

Proximal Heme Cavity II

Scleropages formosus	NSIALDLASLNMQRGRDHALPGYNARWRIGLSQPKTLEELAVVMQNTLAKELMKMYGT	624
Scophthalmus maximus	QHIALDLGSLNMQRGRDHGLPGYNAVRRVIGLSQPNRQELGRVNLNNLARRLLQLYGS	622
Ictalurus punctatus	SKISQDLGSLNQRGRDHALPGYNNEWRRIGLSAPRNVAELGRVNLNATLAQRLLQLYGR	627
Carassius auratus	SHIALDLASLNMQRSRDHSIPGYNARWRIGLSAPKNEQELGRVNMNTKLARLLIELYGT	621
Danio rerio	SHIALDLASLNMQRGRDHAI PGYNARWRIGLSAPQNEQELAVVMNNTKLARLLIELYGT	621
Xenopus laevis	KRLGLDLGAINMQRGRDHGLPGYNAFRREGLSQPNRTEQLAVLNRQLAQLRLLSYGT	607
Homo sapiens	MRIGLDLPAALNMQRSRDHGLPGYNAWRREGLQPETVQGLGTVLRNLKLRKLMQYGT	636
Mus musculus	MRIGLDLPAALNMQRSRDHGLPGYNAWRREGLQPSTVQGLGTVLRNLKLRKLMQYGT	610
Podarcis muralis	ELIGLDLASLNMQRGRDHGLPGYNAWRREGLSEPSDABLAAMVGNSQLAKFIDLTYGT	554
Gallus gallus	EIMGDLAALNLMQRGRDHGLPGYNAWRREGLSQPQTVDELSEVLGNTLTKKLMDLTYGT	497

Scleropages formosus	PDNIDVWLGVAEPFVKGGRVGLPFAHLIATQFQIRQGRDLWENNNGVFSAPAQRASLAC	684
Scophthalmus maximus	PDNIDVWGGVAEPFVKGGRVGLPFAHLIGRQFQIRQGRDLRWHKPKGVFTTRRQKAALS	682
Ictalurus punctatus	TDNIDLWGGIAEPFVKGGRVGLPFSHLIATQFQIRQGRDLWENNMGVFTAQAQKASLSR	687
Carassius auratus	PENIDVWLGVAEPFVKGGRVGLPFAHLISTQFQIRQGRDLWYENHGVFTTKQKASIAS	681
Danio rerio	PENIDVWLGVAEPFVKGGRVGLPFAHLISRQFQIRQGRDLWFENSGVFTTKQKALAS	681
Xenopus laevis	PQNDIWLGAVAEPLVNTGRVGLLALIGDQFRRSRQGRDFRYERPSIFTPAQLSSIER	667
Homo sapiens	PNNIDVWGGVSEPLEPGRVGLLALIGTQFRKLRQGRDFWENEGVFSMQQRQALAQ	696
Mus musculus	PNNIDVWGGVSEPLEPGRVGLLALIGTQFRKLRQGRDFWENPGVFSKQQRQALAS	670
Podarcis muralis	PENIDVWIGALAEPLVGRVGLLALIGTQFRKTRQGRDFWENPGVFTPPQRRILSG	614
Gallus gallus	PDNIDLWIGATAEPLIPRGRVGLLALIGTQFRNLRQGRDFWENPGVFTPQLEELTK	557

Scleropages formosus	VSMARIIIDNTGITRVPK-NPFLNFKQLDLVREKTIPTLNKPLWRPGRNVRNPTENA-	742
Scophthalmus maximus	ATLSKIIIDNTGITVSPH-NAFNVISGKNRLVRRNNIRGVDLTAWRERICSDNSGSPDSC	741
Ictalurus punctatus	VSLASIIIDNTGITRVPR-NPFLSRNQADFVNGSIQGLDLNAWRTEDDSSSETASDEN	746
Carassius auratus	VSLARIIIDNTGISRVPN-NPFRFT-SPGRFVNGDIPAFDLTPWLETKNSIHHSDIGN	739
Danio rerio	VSMARIIIDNTGILKVR-DPFRFR-SPASFVNGNIPAFDLPEPKETDRDSIIPGPPGR	739
Xenopus laevis	VTIARVINDNTRITEVPR-DVFKANQY PANFVRASIPALDLTPWRRRKSABLEDDPMM	725
Homo sapiens	ISLPRIIIDNTGITTVSKNNIFMSNSYPRDFVNGSTLPAALNLASWREAS-----	745
Mus musculus	ISLPRIIIDNTGITTVSKNNIFMSNTYPRDFVSGNTLPKLNLTSWKET-----	718
Podarcis muralis	ASLSRIIIDNTHIQEVPH-DVFKMNHYPSPDFMKEISEIGGLDLSAWKE-----	660
Gallus gallus	ISMSRVIIDNTRIKKLPR-DMFRAS-SPENFVDHEIDMLDLSAWKDEPERGSKGT---	611

Scleropages formosus	-----NSKGIIEPVEIPPTMNDTQYSAFMSRLGNPPKPGQVIFGEATDEGG	792
Scophthalmus maximus	NEVNGTENVTQLSPHQOQLQDNEVQ	767
Ictalurus punctatus	EIPKEKESNDLQDLMLLDK-----QVGQK-----	771
Carassius auratus	EI--QSPKDLDDPEDPDQ-----NLVHKV-----	762
Danio rerio	GPPGERGPQGVAGPPGPPGIPGPPINTTQQSAFFASVNSILPATAKVVVFGQVLYNGQN	799
Xenopus laevis	-----	725
Homo sapiens	-----	745
Mus musculus	-----	718

Podarcis muralis	-----	660
Gallus gallus	-----	611
Scleropages formosus	HYSTETGMFTCMVSGMYQFHFHCILPRDAGSIHLMRNGELVVPFSLRKQEGFVTASGGAV	852
Scophthalmus maximus	-----	767
Ictalurus punctatus	-----	771
Carassius auratus	-----	762
Danio rerio	HYNQTSGMFLCQIPGVYEFEFSCIGTRSLGFVTLKKNRVELTPETVALNTRSLAEGKAV	859
Xenopus laevis	-----	725
Homo sapiens	-----	745
Mus musculus	-----	718
Podarcis muralis	-----	660
Gallus gallus	-----	611
Scleropages formosus	LLKKEDRVWLQGSHGAKVLSADSTFTGYLLFVM	886
Scophthalmus maximus	-----	767
Ictalurus punctatus	-----	771
Carassius auratus	-----	762
Danio rerio	LSLQRGDRVYVEVSRSSANGIGFSSYFSGHILFPV	893
Xenopus laevis	-----	725
Homo sapiens	-----	745
Mus musculus	-----	718
Podarcis muralis	-----	660
Gallus gallus	-----	611

Fig. 5. Alineación múltiple, generada por CLUSTAL, de la secuencia de aminoácidos de la mieloperoxidasa de rodaballo con las secuencias de mieloperoxidasa de otras especies depositadas en la base de datos GenBank. Los aminoácidos idénticos entre todas las especies están marcados con asteriscos (*) debajo de las secuencias. Cuatro dominios potenciales se indican en cursiva (péptido señal), subrayado (propéptido), negrita (cadena ligera) y negrita subrayado (cadena pesada). Los residuos catalíticos, los residuos de enlace hemo, los residuos de cisteína conservados en las cadenas ligeras y pesadas, y el sitio de unión a Ca²⁺ están marcados en amarillo, rojo, azul y verde, respectivamente. Números de acceso del GenBank de la mieloperoxidasa: *Scleropages formosus* (XP018604498.2), *Ictalurus punctatus* (NP001187253.1), *Carassius auratus* (AII80572.1), *Danio rerio* (AAH68379.1), *Xenopus laevis* (NP001081108.1), *Homo sapiens* (NP000241.1), *Mus musculus* (NP034954.2), *Podarcis muralis* (XP028564555.1), *Gallus gallus* (XP015151399.1).

Podarcis muralis -ML-P-GLVPIVVISLSTHANLAHAENDSKHERPLVKEALARARQVLVSAYHRSRSGK 57
 Scleropages formosus -MNTLACLVLVLGIYLSV----FWHATTGEDEMRPFIKALEDAKTIIVDKAYKYSQESL 54
 Carassius auratus -MDLHTFLFVVVCCCC-A-----LSLGE-EESSPGRFFILDSFEAKKIVDAAYKYSRDES 52
 Danio rerio -MNLPTFLFVVVCCCC-A-----LSMGAEESSPGRFFILDSFEAKKIVDAAYKYSRDES 53
Scophthalmus maximus --MLFSVLLVGLGLVLP----AHSVPTGEHLGSSLLQNCFEHLQQAQKIVDDAYFYSAE 53
 Larimichthys crocea --MLFSVLLVGLVCLVP----AHSKQAEYELGTPLLQSCFEAKKIVDDAYFYSAE 53
 Xenopus laevis -MAPADLWGLVLLILASVQGTASSYDGVVEELDNLLISCTKEAKHLVDTAYKTRMLMK 59
 Gallus gallus -MKAETCVLVLAKIILFRGSASSYDLPEKLSDAFLLSSVDEAKQLVDSAYKDRTRDK 59
 Homo sapiens -MHLPLALAGVLA TLVLAQCEGTDPA SPGAVETSVLRDCIAEAKLLVDAAYNWTQKSIK 59
 Mus musculus MMQQLALVGLATLTLTQHAEGTAPASPSFVTSVLRDCAEAKLLVDTAYNHTQKSIM 60

: : . * : . * * : :

Podarcis muralis AVLTKGSLASADLLSVFKHPEAETNAVAHAAELMDTVELIRQLVYKREKRYANMSGVLS 117
 Scleropages formosus SRVQKHSFASADALRLVRQPSRELC SAVRAADYMENTLRLIQERQPHVHKRS LNATDLIT 114
 Carassius auratus ARVRRDVIKPSDKLRLKQPKARKTREVRAADYMQTLRLISEKAHVHKRSINATNLLT 112
 Danio rerio ARVRKDVIKPSDKLRLKQPKARKTREVRAADYMQTLRLISEKAHVHKRSINATNLLT 113
Scophthalmus maximus RVRKVEVVRPHDALRLKQPRGETRSVRSADYMAQTLRLQLQERVHRHVKRS LNATDLS 113
 Larimichthys crocea RVRKVEVVRPHDTRLMKQPRQTRVAVRSADYMAQTLRLQLQERAHVHKRS LNATDLS 113
 Xenopus laevis DRLLRRRTVSASDLMA YFKQPVCS-RNAIRAADYMGTTLLQLLSHKLKPFFHRPFNITELL 118
 Gallus gallus KNLENDALNPIELLYFKQPVAGTRAAIRAADYMGTTLLTLLKEKLSRVVKGDFNVTDMLT 119
 Homo sapiens QRLRSGSASPMDLLSYFKQPVAAATRTVVRAADYMHVALGLLEEKLPQRSQPSFNVDVLT 119
 Mus musculus QRLRSGSASPMDLLAYFKQPVAAATRRVVQAADYMHVALGLEERLPGRS RPFNATDVL 120

: : : : : * : : : : * : : : : * : : : :

Podarcis muralis GHDLSTLAEVGTAAQLRPIKSDTCLTEKYSIDGTNNRKNPLWGAANTYARWLPA 177
 Scleropages formosus REELRVIQLTGTARVQTPNRTTTPYLNKYRVTGVTNNLKNPRI GASNTPLARWLPP 174
 Carassius auratus QDELNTIQHLTGTAQTRPPSRTTTPLNKYRITINNNRKNPLLGASNTAFTRWLPAQ 172
 Danio rerio QDELQITRMTGTAQTRPPSRTTTPLNKYRITAGVNNRKNPLLGASNTPFARWLPAQ 173
Scophthalmus maximus EEDLTLNLSKITGAARVRVPEVRTTANVYRITITSLNNLKNPLLGASNTPFSRLPFA 173
 Larimichthys crocea REDLERLAEITGSAQISFSPSGFTFNKNYRQITISLNNLKNPLLGASNTPFTRWLPAE 173
 Xenopus laevis ETQIDAIYKLTGAYQHLPSAQ---ESPYRITGNNRKNPLLGASNTGFTRWLPPV 174
 Gallus gallus PAQMGLLEFKVGTAEQNKVNEF---SSRYRITGNNRKNPLLGASNRLARWLPAE 176
 Homo sapiens EQLRLLSQASGALRDQAERC---SDKYRITGNNRKNPLLGASNQLARWLPAE 174
 Mus musculus EPQLRLLSQASGALQDQAERC---SNKYRITGNNKHPWLGSANQLARWLPAE 175

: : : : : * : : : : * : : : : * : : : :

Distal Heme Cavity I

Podarcis muralis YEDGFSAPKGNQSKTYNGFSLPLVRQVSHIELHTRNENISLSDSYTHMLVENGWTHD 237
 Scleropages formosus YEDGISQPVGWDPTRLYNGHLLPLVRLVSNRILSTADADIESDREFTFMLTIFGQWVHD 234
 Carassius auratus YEDGISQPKGWDLKMHNGALLPLVRLVSNRILSTADADIESDREFTFMLTIFGQWVHD 232
 Danio rerio YEDAVSQPKGWDPNKLYNGAALPMVRLVSNRILATADADIESDHDFTFMLTIFGQWVHD 233
Scophthalmus maximus YDDGISQPKGNWNRLL-NNFLLPLVRQVSNINLNTDAAVVS DREFTHMVTLFGQWVHD 232
 Larimichthys crocea YEDGVSQPKGNQNTI-NNFLLPLVRQVSNINLSTDAGVVS DPEFTHMVTLFGQWVHD 232
 Xenopus laevis YEDGLSVPRGWNTENLPIGFFPLARAVSNEIVRFENENLTLDEGRALIFMQGQWTHD 234
 Gallus gallus YEDGVSIPHGWNTNRCSFGYFFPLVRRVSNIEIVRFPPNQLKFDQQRSLMFMQWGF 236
 Homo sapiens YEDGLSLPFGWTPSRRRNGFLLPLVRAVSNQIVRFNERNLTS DRGRALMFMQWGF 234
 Mus musculus YEDHRSLPFGWTPGKRRNGFLLPLVRVDSNQIVRFPSKILTS DRGRALMFMQWGF 235

* : * * * : : : * : * * * : : : * : * * * : : : * : * * * : : * : * * * :

Podarcis muralis MDLTPQSASTVFSMDGTDVSHGIVNNRNPFFIQIPAGDLRLGGGTMKMPFIRSSPAGS 297
 Scleropages formosus LSIPTTSPSIQSFNNGIKDRSDQAEPPFFIRIPKEDPRFGNDSKIPFFRSAPAGT 294
 Carassius auratus LTFTPFSPSIKSFSSGLDQDQSERSEPFPIPA PPGDRL--KPGTLPVFRSSPAGS 290
 Danio rerio LTFTPFSPSIRSFNSGIDENSERSEPFPI SAPPGQRL--RNTLPVFRSAPAGT 291
Scophthalmus maximus LTFTPFSPSIRSFNSGVNDESSEKTEPFIPIPPGDRPLSRPDSIPAFRSAPAGT 292
 Larimichthys crocea LTFTPFSPSIVSFSNGVNDSESERVEPFLPIPIPPGDRPLSPGSDSIPAFRSAPVGT 292
 Xenopus laevis LDLSPETPARSTFLEGIDDTNKAKEPPFFLKI PPNDRPINSQ-SDIPLFRSSPVP 293
 Gallus gallus LDFSPESPARVTFNGRVDHTSAKLPPFFFIQIPPNDRPKNT-RDI PFFRSAPADS 295
 Homo sapiens LDFSPESPARVAFVAGVDERTAQLPFFFIKIPPNDRPKNQ-RDI PFFRSAPAFQ 293
 Mus musculus LDFSPESPARVAFSMGVDEKTAQLPFFFIKIPPNDRPKNQ-RDI PFFRSAPAFQ 294

: : * : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

Podarcis muralis GQSSFLQGQ-LQPREQLNSLSTVIGMIYGSTASLARKLRNFTQALGLLAVNQEFSDGG 356
 Scleropages formosus GTTGHVFGA-ANIRQMNALDPAFVAQVYGSEDAQLFLRDLTNDGGLRVNDRFTDNG 353
 Carassius auratus GNTAYMFGGNPNVREQINALDPAFVAQVYGSDDGLAKELRDLTNDGGLRVNKNFDNG 350
 Danio rerio GTAYMFGVEPNVREQINTLPAFVAQVYGSDDGLAKELRDLTNDGGLRVNKNFKDNG 351
Scophthalmus maximus GYSAYNFGGEPNKREQINALDPAFVAQVYGSSEKLA LNLNLSNDGGLRVNTEFNDG 352
 Larimichthys crocea GNSAFNFGGVANKREQINALDPAFVAQVYGSDDKLAFLRDRNSNLGLLRNTQFRDNR 352
 Xenopus laevis GS-----PVREQINLSTVIGMIYGSQVSDWPLAVKLRNNTNQLGLMAINQRFDTNG 344
 Gallus gallus GR-----ATREQINLSTVIGMIYGSQVSDWPLAVKLRNNTNQLGLMAINQRFDTNG 346
 Homo sapiens NK-----NVRNQINALDPAFVAQVYSEVLSLRLNRNTNYLGLLAINQRFQDNG 345
 Mus musculus NR-----NKVRNQINALDPAFVAQVYSEVLSLRLNRNTNYLGLLAINQRFQDNG 346

* : * : * * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

Distal Heme Cavity II

Podarcis muralis LPLLPFAEKKSNPVALTRD-SCLANASDVFVAVAGDSRNLHLGVLQVHTVFLRESNRI 415
 Scleropages formosus REHLFPANT--LGPSTRQKITNTSGLEEVFVAVAGDVRVNNIALGSIHTVFLREHRL 411
 Carassius auratus REHLPFTNVE-SKMATRQKILNDTTLTEVFFIAGDILVDENTALTSVHTLFLVREHRL 409

FRANCISCO FONTENLA IGLESIAS

Danio rerio	RELLPFTSVN-TNIFATRQKILNDSTLTEVPIFIAGDAEAVNINPALNSLHTLFVREHNRL	410
Scophthalmus maximus	RELLPFTSTLQ-AQMCATRKRVTNDTNAKEVPIFIAGDVRVDNINPALNLSIHTLFMREHNRL	411
Larimichthys crocea	RELLPFPPLN-AKMAATRARVTNDTNAREVPIFIAGDVRVDNINPALNLSIHTLFMREHNRL	411
Xenopus laevis	LPFLPFPETAEE-EDFVLTN-----RSSGIPFLGGDPRVSSQPLTAFHTLFFVRAHNNI	397
Gallus gallus	MAYLPPFVRMS-KDFPLKVS-----GSANIPFLAGDSRASMLELACMHTLFFVREHNRL	399
Homo sapiens	RALLPFDNLH-DDFPLLTN-----RSARIPFLAGDTRSTETPKLAAMHTLFFMREHNRL	398
Mus musculus	RALLPFDNLH-EDFPLLTN-----RSARIPFLAGDTRSSSTPKLTALHTLFFVREHNRL	399
	*** * :*:*: * * : * :*:*: * * :	
Podarcis muralis	ATTLHLQNLQWSEIILYQETRKVIGAYLQIINWRDYVPKILGPEATEAYLPPYSYGYDES	475
Scleropages formosus	ARALRQLNPHWDSSETLYQEARKIVGGYHQIIVFRDYLRHIVGPDAMARFLPAYPGYDEN	471
Carassius auratus	ARALHVINPTWSSETLYQEARKIVGAYNQIILVFKEYLPHIVGPDVNRHLGQYPGYDEN	469
Danio rerio	ARALHVLNPTWSSETLYQEARKIVGAFNQIILVKEYLPLIVGPDAYNRHLGQYPGYDEN	470
Scophthalmus maximus	AQSLKRLNPHWDSSETLYQESRKIMGAYTQIVVFRDYLPHLILGPDNAVRTQIGPYSYGNPNV	471
Larimichthys crocea	ARALNRINPHWDSSETLYQEARKIMGAYTQVFRDYLPHLILGPDNAVRTQIGPYSYGNPNV	471
Xenopus laevis	AARLRELNRNPTWSSETLYQEARKIIGGLKQKITYKDWLPLLGSEM-AAVLPAYRSYVES	456
Gallus gallus	AIGLKRNLNPHWNGERYIQEARKIVGAMIQIITYRDYLPPLLGRNL-QRWIPSYKGYKESV	458
Homo sapiens	ATELRRLNPNRWNGDKLYNEARKIMGAMVQIITYRDFLPVLVIGKARARRTLGHYRGYCSNV	458
Mus musculus	AAELRLNPNRWNGDKLYNEARKIVGAMVQIITYRDFLPVLVIGKARARRTLGHYRGYCSNV	459
	* * :*:*: * * : * :*:*: * * : * :*:*: * * :	
	Proximal Heme Cavity I	
Podarcis muralis	DPRTSNVFTAAAFRFAHVTINPFLSRLDENFEENPSPHSISLHQSFPSWRIIEEGGIDP	535
Scleropages formosus	DPRTSNVFTAAAFRFAHVTINPFLSRLDENFEENPSPHSISLHQSFPSWRIIEEGGIDP	531
Carassius auratus	DPTIANVFATAAFRFAHLAIQPIIFRLDENYQNHKPFVSVLFEAFFSPWRVIFEGGIDP	529
Danio rerio	DPTIANVFATAAFRFAHLTIQPIIFRLDENYKHPFVSVLFEAFFSPWRVIFEGGIDP	530
Scophthalmus maximus	DPRTSNVFTAAAFRFAHLAIQPFLLRLDANRENRRPFSVSLYRAFFTPWRVIFEGGIDP	531
Larimichthys crocea	DPRTSNVFTAAAFRFAHLAIQPFVLRDLNANRENTREPSVLPKFAFFTPWRVIFEGGIDP	531
Xenopus laevis	DPRTSNVFT-VVFRMGHTLIQPFVLRDLADGYRPLGPEPQIPLKHTFFNSWRVVEGGIDP	515
Gallus gallus	DPRTSNVFT-LAFRFAHSAIPEPSVGRNLNQYQSTYPK--LKLSTFFGVHIVKGGGIDP	515
Homo sapiens	DPRTSNVFT-LAFRFGHTMLQPFMFRLDQYRASAPNSHVPLSSAFFASRWVIFEGGIDP	517
Mus musculus	DPRTSNVFT-LAFRFGHTMLQPFMFRLDQYRASAPNSHVPLSSVFFASRWVIFEGGIDP	518
	** :*:*: * * : * :*:*: * * : * :*:*: * * :	
	Proximal Heme Cavity II	
Podarcis muralis	ILRGEIFTLAKLQATQMMPEELTEKLFHPKALSLDLAAINLQGRDRHGLLGYNSWRFF	595
Scleropages formosus	LLGLLGRPAKLAQDHHMLVDAREKLFQFTARLALDLGSLNMQGRDRHGLLPGYNARWRF	591
Carassius auratus	LLRGLIGRPAKLNQDHHMVALRERLFAFTSHIALDLASLNMQGRDRHGLLPGYNARWRF	589
Danio rerio	VLRGLIGRPAKLNQDHHMLVNLRELERLFAFTSHIALDLASLNMQGRDRHGLLPGYNARWRF	590
Scophthalmus maximus	LLRGLIGRPAKLNQDHHMVDALRERLQFVQHIALDLGSLNMQGRDRHGLLPGYNARWRF	591
Larimichthys crocea	LLRGLIGRPAKLNQDHHMVDALRERLQFVQHIALDLGSLNMQGRDRHGLLPGYNARWRF	591
Xenopus laevis	LLRGLMANRAKLNQQLVVDLRELERLFLVKFRIGLDTANMQGRDRHGLLPGYNARWRF	575
Gallus gallus	FLRNLMAKAKLMTQDQMMVDELDRDLHSEQIERIGLDLAAINMQGRDRHGLLPGYNARWRF	575
Homo sapiens	ILRGLMATPAKLNQDAMLVDELDRDLFRQVRRIGLDLAAINMQGRDRHGLLPGYNARWRF	577
Mus musculus	ILRGLMATPAKLNQDMSLVDELDRDLKLFQVQVRRIGLDLAAINMQGRDRHGLLPGYNARWRF	578
	* * :*:*: * * : * :*:*: * * : * :*:*: * * :	
Podarcis muralis	GLPEAHTFSDLQHIILNSSYLAHKLLKLYGTPENIDVWIGAIAPLPSARVGGELLA LL	655
Scleropages formosus	GLSQPRNEEELAEVMDNPDLAKKLELYGTPDNI DVWLLGSEIPEFPVSGRVGLPFLI LI	651
Carassius auratus	GLSAPKNEQELGVVMKNTKLARLLELYGTPENIDIVLGGVAEFPVSGRVGLPFLI LI	649
Danio rerio	GLSAPKNEQELAVVMNNTLARKLELYGTPENIDIVLGGVAEFPVSGRVGLPFLI LI	650
Scophthalmus maximus	GLSQPRNQAEELRVLNNNLARRLLQLYGSFDNIDVWVGVAEFPVSGRVGLPFLI LI	651
Larimichthys crocea	GLSQPRNQAEELRVLNNDLARRLLQHYGTPDNI DVWVGVAEFPVSGRVGLPFLI LI	651
Xenopus laevis	GLSAPSNVNELAAVLNRRNLAEKFKLYGTPENIDIVWVGVAESLVNRGRIGKLT LI	635
Gallus gallus	GLPQPYDVRSLGQVKNKLNARKFMKLYGTPDNI DVWVGVAEFPVSGRVGLPFLI LI	635
Homo sapiens	GLSQPRNLAQLSRVLKNQDLARKFLRLYGTPDNI DIWIGAIAPLPSARVGGELLA LI	637
Mus musculus	GLSQPRNLAQLSRVLKNQDLARKFLRLYKTPDNI DIWIGAIAPLPSARVGGELLA LI	638
	*** * :*:*: * * : * :*:*: * * : * :*:*: * * :	
Podarcis muralis	GRQFQALRDGRDFWNEGVFTPRQREBELAKVTLFQIILDNTHLHLHPADVSTSHFSPD	715
Scleropages formosus	AMQFQKIRQDRDLNWEKDGVTSSQRESLAATSLNRIIDNTGTTDVPKNPFLPHWPGTS	711
Carassius auratus	STQFKIRQDRDLWFENHGVFTTKQKASLASVSLARIIDNTGTSRVPNNPFRFTS-PGR	708
Danio rerio	STQFKIRQDRDLWFESNGVFTTKQKALASVSLARIIDNTGTLKLVPRDPFRFRS-PAN	709
Scophthalmus maximus	GRQFQIRQDRDLWHEKPGVFTTRQKKAALSSATLSKIIDNTGTTVPHNAPFNVISGKNR	711
Larimichthys crocea	ARQFRNTRQDRDLWYQNRGVFTPAQRNALATASLSRIIDNTGINTVPTNVNVLRSRNR	711
Xenopus laevis	GNQFRRARQDRDFYEQPSVFTNEQRASIERVTLARVIDNTKITEVPRNVFLGNYPDRD	695
Gallus gallus	GTQFRNTRQDRDFWVWENTGVFTAQORSSSLAKISLSRIIDNTHITKVSRNIFQANSYPHS	695
Homo sapiens	ENQFRRARQDRDFWVWQKRGVFTKQKALSRISLSRIIDNTGTTVSRDIFRANIYPRG	697
Mus musculus	ENQFRRARQDRDFWVWQKRGVFTKQKALSRISLSRIIDNTGTTVSRDIFRANIYPRG	698
	** :*:*: * * : * :*:*: * * : * :*:*: * * :	
Podarcis muralis	FVSIKSSQIPRVLDLAAWREDSADTCPGPVPLV--EGAHYVQCKASVFFECWPYIREGP	772
Scleropages formosus	FVSIKSSQIPRVLDLAAWREDSADTCPGPVPLV--EGAHYVQCKASVFFECWPYIREGP	764
Carassius auratus	YVNIKSSQIPRVLDLAAWREDSADTCPGPVPLV--EGAHYVQCKASVFFECWPYIREGP	755
Danio rerio	FVNIKSSQIPRVLDLAAWREDSADTCPGPVPLV--EGAHYVQCKASVFFECWPYIREGP	751
Scophthalmus maximus	LVRNIN--NIRGVDLTAWRERICSDNSGSPDSCEVNGTENVTQLSPHQQ----PD---	761
Larimichthys crocea	LVRNIN--SIRSLNLAWRERICSDNSGSPDSCEVNGTENVTQLSPHQQ----DPEDH	764

Xenopus laevis	FVA	S--RIP	LDL	NPKVA	-----	713
Gallus gallus	FVS	S--SIP	KL	DL	RAWKSN	CMEESTE
Homo sapiens	FVN	S--RIP	RL	NLS	AWRGT	-----
Mus musculus	FVS	S--RIP	KL	NLS	AWRGR	-----
	:	*	:	:	.*	*
Podarcis muralis	SSITCNVEDR	---E---	WSTVLPVCR	DI	DECEHGQEN	PCPSLQICVNI
Scleropages formosus	PSPSIHTE	--PSAF	FAMLLGFS	NPQ	PNKPIVFQ	Q---TIYNRQ
Carassius auratus	PGPPINTT	QGQSAFF	ASVGTIL	PVTAK	VVVSFQ	---VLYNGQ
Danio rerio	GDLQEN	-----	VVHRV	-----	-----	-----
Scophthalmus maximus			<u>QDNEVQ</u>			
Larimichthys crocea	---	VDFQ	GLED	NEVQ	---	---
Xenopus laevis	-----	-----	-----	-----	-----	713
Gallus gallus	-----	-----	-----	-----	-----	728
Homo sapiens	-----	-----	-----	-----	-----	715
Mus musculus	-----	-----	-----	-----	-----	716
Podarcis muralis	IPSQDGTTC	IGGGQ	VTVTSL	AAAAA	IVAGAI	SLIAVAVAL
Scleropages formosus	KF---	DYHCS	L	TNG	GDIVL	QQN---GLEVL
Carassius auratus	EF---	QFSC	IGTK	FLG	IVTL	KKN---YAVQL
Danio rerio	-----	-----	-----	-----	-----	762
Scophthalmus maximus	-----	-----	-----	-----	-----	767
Larimichthys crocea	-----	-----	-----	-----	-----	776
Xenopus laevis	-----	-----	-----	-----	-----	713
Gallus gallus	-----	-----	-----	-----	-----	728
Homo sapiens	-----	-----	-----	-----	-----	715
Mus musculus	-----	-----	-----	-----	-----	716
Podarcis muralis	PQDCSKEG	QNP	DSS	-----	-----	899
Scleropages formosus	WLQTNTE	GLN	F	TAD	S	HFTGHLVFAV
Carassius auratus	WIEVSKG	ADG	IRK	SSY	F	SGHILFPV
Danio rerio	-----	-----	-----	-----	-----	762
Scophthalmus maximus	-----	-----	-----	-----	-----	767
Larimichthys crocea	-----	-----	-----	-----	-----	776
Xenopus laevis	-----	-----	-----	-----	-----	713
Gallus gallus	-----	-----	-----	-----	-----	728
Homo sapiens	-----	-----	-----	-----	-----	715
Mus musculus	-----	-----	-----	-----	-----	716

Fig. 6. Alineación múltiple, generada por CLUSTAL, de la secuencia de aminoácidos de la mieloperoxidasa de rodaballo con las secuencias de la peroxidasa de eosinófilos de otras especies depositadas en la base de datos GenBank. Los aminoácidos idénticos entre todas las especies están marcados con asteriscos (*) debajo de las secuencias. Cuatro dominios potenciales se indican en cursiva (péptido señal), subrayado (propéptido), negrita (cadena ligera) y negrita subrayado (cadena pesada). Los residuos catalíticos, los residuos de enlace hemo, los residuos de cisteína conservados en las cadenas ligeras y pesadas, y el sitio de unión a Ca^{+2} están marcados en amarillo, rojo, azul y verde, respectivamente. Números de acceso del GenBank de la mieloperoxidasa: *Podarcis muralis* (XP028592557.1), *Scleropages formosus* (XP018601531.2), *Carassius auratus* (XP026075235.1), *Danio rerio* (NP997944.2), *Larimichthys crocea* (XP010734640.3), *Xenopus laevis*

(NP001081848.1), *Gallus gallus* (XP015151416.1), *Homo sapiens* (NP000493.1), *Mus musculus* (NP031972.2).

3.2. Análisis de las muestras mediante Western blot

En las muestras reducidas se observa una banda de peso molecular alrededor de 75 kD (Fig. 6). Asimismo, se detectó una banda de alrededor de 150 kD de peso molecular en condiciones no reductoras, lo que sugiere una conformación dimérica de la mieloperoxidasa de rodaballo (Fig. 6).

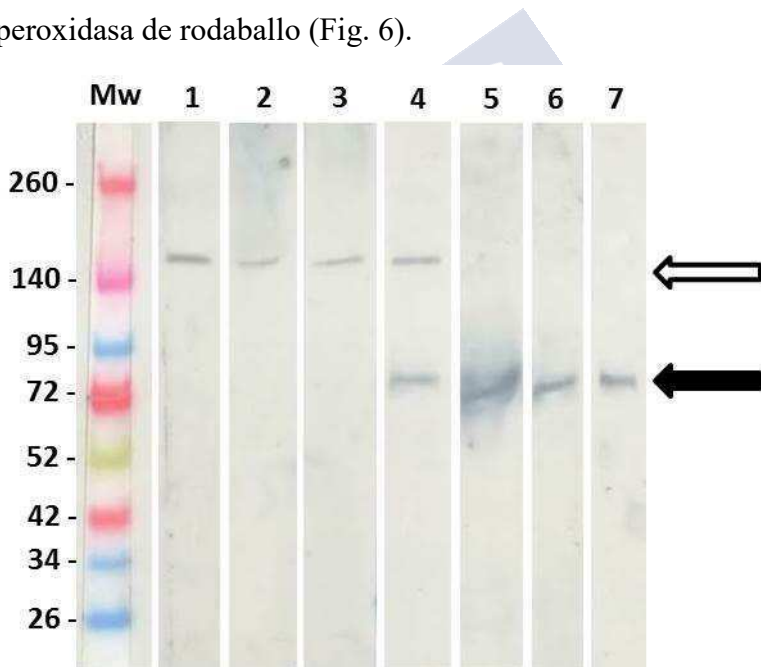


Fig. 6. Western blot utilizando anticuerpos de suero de ratón anti-Mpo de rodaballo, en condiciones no reductoras (carriles 1, 2, 3) y reductoras (carriles 4, 5, 6, 7). Carril Mw: marcador de peso molecular en kDa. Carril 1: extracto de leucocitos sanguíneos; carril 2: suero; carril 3: líquido peritoneal; carril 4: extracto de leucocitos sanguíneos; carril 5: suero; carril 6: líquido peritoneal; carril 7: mieloperoxidasa de rodaballo purificada. La flecha blanca indica la

banda alrededor de 150 kDa y la flecha negra muestra la banda alrededor de 75 kDa.

3.3. Expresión de la mieloperoxidasa de rodaballo en diferentes tejidos

El nivel más alto de expresión se observó en el riñón anterior y las branquias. Cierta expresión también se observó en los glóbulos blancos de la sangre, el bazo, el músculo con piel y el estómago. Los ciegos pilóricos, el intestino, el páncreas, el hígado, el músculo, el corazón y el cerebro presentan una expresión muy baja de mieloperoxidasa (Fig. 7).

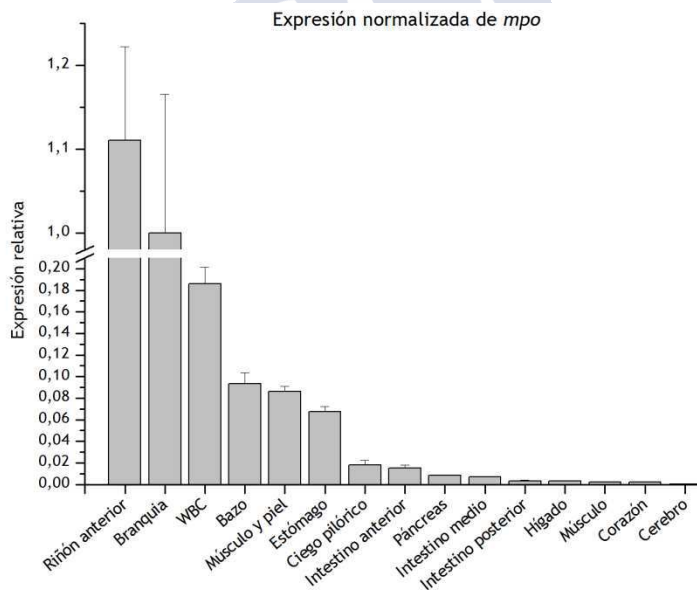


Fig. 7. Análisis de expresión del gen de la mieloperoxidasa (*mpo*) mieloperoxidasa en diferentes tejidos de rodaballo por RT-qPCR. La expresión relativa del gen de mieloperoxidasa se normalizó con la expresión del gen del

factor de alargamiento 1-alfa. Los datos se muestran como media \pm SE (n = 3).
WBC: glóbulos blancos.

3.4. Localización de células peroxidasa-positivas por inmunofluorescencia

Se utilizaron muestras de bazo, riñón anterior, leucocitos sanguíneos y líquido peritoneal. Las secciones del riñón anterior muestran gran cantidad de células peroxidasa positivas formando grandes grupos dispersos por el riñón, pero con diferentes morfologías que podrían corresponder a granulocitos en diferentes etapas de desarrollo, desde mieloblastos/mielocitos hasta neutrófilos (Fig. 8 A). En el bazo, aparecen pocas células peroxidasa positivas dispersas por todo el parénquima con gránulos en sus citoplasmas, presentando una morfología similar a los neutrófilos (Fig. 8 B). Los frotis de leucocitos sanguíneos muestran células de diferentes diámetros (4-6 μm) con una morfología similar a los neutrófilos (células con mayor fluorescencia) (Figs. 8 C y D). Por otro lado, los frotis de líquido peritoneal muestran un número mucho menor de células peroxidasa positivas, también similares a monocitos y neutrófilos.

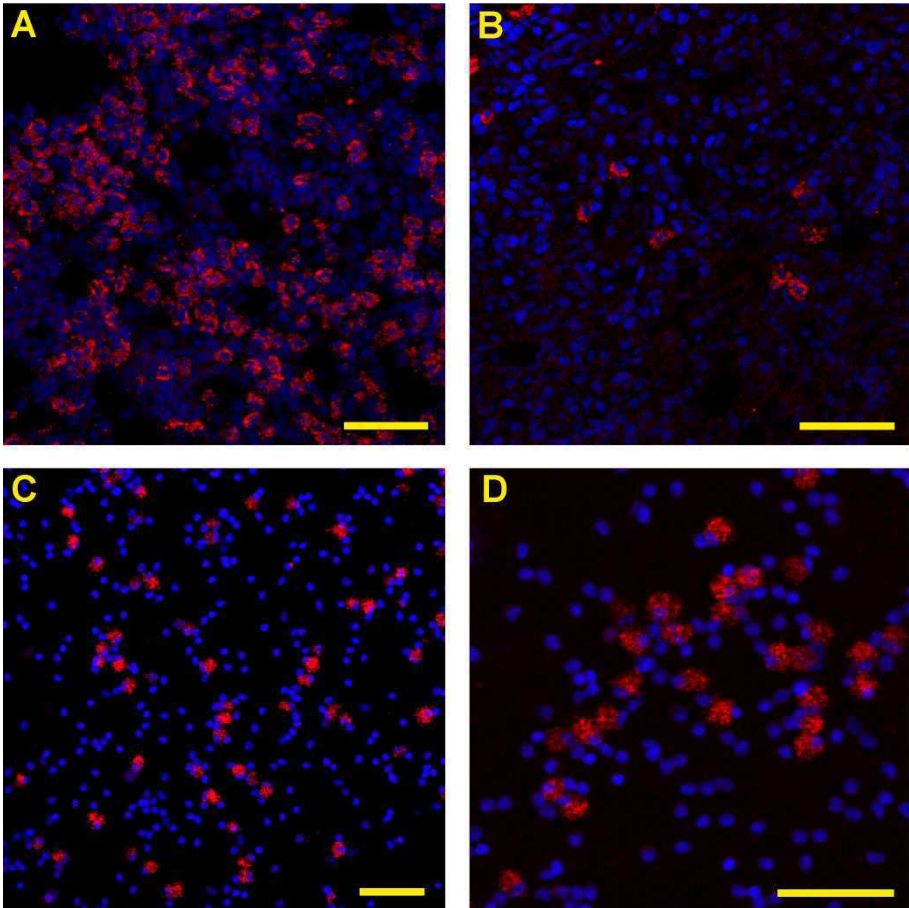


Fig. 8. Imágenes de microscopía confocal de secciones de riñón anterior (A), bazo (B), leucocitos sanguíneos (C) y células de la cavidad peritoneal (D) que muestran la distribución basal de células peroxidasa-positivas. Las muestras se incubaron con suero de ratón inmunizado con mieloperoxidasa de rodaballo y anticuerpos de conejo anti-IgG de ratón marcado con rodamina y se contrastaron con DAPI (azul). Barra: 25 μ m.

3.5. Modificación de la expresión génica en leucocitos de riñón incubados con mieloperoxidasa de rodaballo

Se analizó la expresión de varios genes del sistema inmunitario en leucocitos de riñón incubados con mieloperoxidasa (25 o 50 µg de proteína/ml) durante 1, 6 y 24 h (Fig. 9). La incubación con peroxidasa indujo una disminución en la expresión de *illb* a una y seis horas, y un incremento a las 24 h. Otro gen proinflamatorio como el *tnfa* no parece verse afectado. La expresión de otros genes que participan en respuestas inflamatorias como *il22*, *il8*, o *ifng*, aunque con funciones claramente diferentes, tampoco parecen verse afectados.

Sin embargo, se observó sobreexpresión de la integrina CD11b/CD18 (integrina α M/integrina β 2) a las 24 h en las células expuestas a la concentración más alta de Mpo. Por otro lado, las interleucinas proinflamatorias *tnfa*, *il12b* e *il17* y la *lox* (enzima proinflamatoria) se regularon positivamente a las 24h. La *mpo* no se regula por sí misma ni a las horas ni a las concentraciones probadas. El *mmif* (factor inhibidor de la migración de macrófagos) se expresó altamente a las 24 h con la concentración más alta, siendo su respuesta directamente proporcional a la concentración de Mpo utilizada. Curiosamente, el *tcg* se regula negativamente a las 6 h y las 24 h con la concentración más alta de MPO. También se observó sobrerregulación en el *mhci* a las 24 h con la concentración más alta de Mpo.

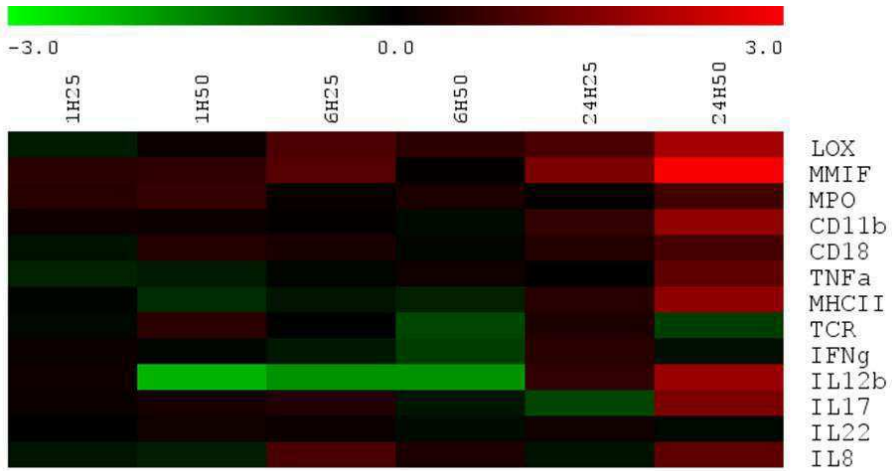


Fig. 9. Mapa de calor que muestra la expresión de diferentes genes en leucocitos de riñón anterior después de la exposición a mieloperoxidasa. La expresión relativa del gen de mieloperoxidasa se normalizó con la expresión del gen del factor de elongación 1-alfa. Los datos se muestran como media \pm desviación estándar (n=3). *lox*: lipoxigenasa; *mmif*: factor inhibidor de la migración de macrófagos; *mpo*: mieloperoxidasa; *CD11b*: integrina α M; *CD18*: integrina β 2; *ifng*: interferón γ ; *tnfa*: factor de necrosis tumoral α ; *il12b*: interleucina 12B; *mhcii*: complejo mayor de histocompatibilidad clase II; TCR: receptor de células T; *il22*: interleucina 22; *il17*: interleucina 17; *il8*: interleucina 8. Las células se incubaron con mieloperoxidasa de rodaballo (25 y 50 μ g/ml) durante 1, 6 y 24 h. Las células control se incubaron únicamente con el medio.

4. Discusión

En un estudio previo de nuestro grupo caracterizamos parcialmente una peroxidasa de rodaballo que denominamos mieloperoxidasa (Mpo) (Castro *et al.*, 2008b). En el presente trabajo, hemos clonado y completado la secuencia del gen de esta peroxidasa

mediante RACE y hemos caracterizado la proteína y analizado algunos aspectos funcionales de esta enzima. Esta proteína está constituida por 767 aminoácidos, mientras que en los trabajos publicados en otras especies de peces varían entre 762 y 884 aminoácidos (Bennett *et al.*, 2001; Yeh y Klesius, 2010; Podok *et al.*, 2014; Elvitigala *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018). En otros grupos, sin embargo, el gen codifica una proteína con un menor contenido de aminoácidos que en el rodaballo, presentando 611, 660, 718, 725 y 745 aminoácidos en el pollo (*Gallus gallus*), lagartija roquera (*Podarcis muralis*), ratón (*Mus musculus*), rana de uñas africana (*Xenopus laevis*) y humanos (*Homo sapiens*), respectivamente (número de acceso al GenBank en el mismo orden: XP015151399.1; XP028564555.1; NP034954.2; NP001081108.1; NP000241.1).

El gen de la peroxidasa de rodaballo que hemos secuenciado está constituido por 14 exones y 14 intrones, aunque uno de los intrones está localizado en la región 5' UTR. El gen de la *MPO* humana está formado por 12 exones y 11 intrones, no estando presente el intrón de la región no traducida del extremo 5' (Morishita *et al.*, 1987; Klebanoff, 2005). Desconocemos cual es el papel del intrón localizado en la región 5'UTR, y también desconocemos si existen intrones en esa región del gen de la *mpo* de otras especies de peces. La presencia de intrones en esa región del gen no es extraña, más bien al contrario, y ha sido asociada a una regulación de la expresión. Los genes que expresan intrones en este extremo están entre los más

expresados del genoma y estos intrones estimulan la acumulación de ARNm (Rose, 2019). Dado que el gen de la *MPO* es seguramente uno de los que más se expresan dentro sistema inmunitario, es posible que ese intrón favorezca la expresión y acumulación de ARNm de la *MPO*. Además, la secuencia deducida de esta peroxidasa de rodaballo presenta una estructura básica consistente en un péptido señal (17 residuos), un propéptido (118 residuos), una cadena ligera (113 residuos) y una cadena pesada (519 residuos), presentes en la MPO de humanos (Morishita *et al.*, 1987) y también encontradas en los peces óseos *Epinephelus coioides* (Wang *et al.*, 2018), *Oplegnathus fasciatus* (Elvitigala *et al.*, 2015) y *Ictalurus punctatus* (Yeh y Klesius, 2010).

Hemos identificado, por medio de Western blot, una banda de aproximadamente 150 kDa en condiciones no reductoras y otra de 75 kD en condiciones reductoras en leucocitos sanguíneos, suero y líquido peritoneal. La MPO madura de humanos aparece como un homodímero simétrico sin propéptido de aproximadamente 150 kD unido mediante puentes de hidrógeno, que rompe en dos subunidades en condiciones reductoras (Klebanoff, 2005; Hannson *et al.*, 2006). Pesos moleculares similares se han encontrado en otras especies como el perro (Harrison *et al.*, 1977) o el caballo (Mathy-Hartert *et al.*, 1997). En estudios previos, habíamos identificado una banda de 75 kDa en condiciones reductoras, pero, a pesar de aislar una molécula de aproximadamente 150 kDa por cromatografía de afinidad, no

encontramos la forma dimérica mediante Western blot (Castro *et al.*, 2008b). Ahora hemos determinado, usando un gel de gradiente, que, al igual que ocurre en humanos (Hansson *et al.*, 2006), esta peroxidasa de rodaballo aparece como un homodímero de aproximadamente 150 kDa en su forma madura. Todos estos datos, junto al hecho de que el peso molecular de la proteína calculado sin propéptido es de 71 kDa y que solo observamos una banda en cada Western blot, hacen pensar que la MPO aparece sin propéptido mayoritariamente en las células y fluidos analizados. La diferencia de peso molecular entre lo esperado de 71 kD y los alrededor de 75 kDa observados, se puede deber a que la Mpo es una proteína glicosilada (Castro *et al.*, 2008b) que presenta hasta 8 posibles zonas de glicosilación, lo que contribuye a aumentar el peso molecular de la proteína y retardar su migración (Stanley, 2011). Además, también se sabe que el contenido de aminoácidos ácidos de una proteína afecta a las diferencias entre el peso molecular observado y el esperado en el pez cebra, *Danio rerio* (Guan *et al.*, 2015).

En rodaballo, al igual que lo descrito en otras especies de peces (Yeh y Klesius, 2010; Podok *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2018), la expresión más alta de esta peroxidasa se observa en riñón anterior, aunque en otro estudio en *O. fasciatus* se encontró la expresión más elevada en sangre (Elvitigala *et al.*, 2015). La mayor expresión de MPO en mamíferos ocurre en células de la médula ósea, sitios donde se encuentran los mieloblastos y mielocitos. A medida que estas células van madurando se reduce la expresión del gen y, en el caso de humanos, los neutrófilos

maduros circulantes dejan de expresarla (Cowland y Borregaard, 1999; van der Veen *et al.*, 2009). El riñón anterior de los teleósteos es el sitio de formación de neutrófilos (Press y Evensen, 1999), lo que explica que sea el órgano donde se produce una mayor expresión. A diferencia de lo que ocurre en humanos, donde no hay expresión de *MPO* en neutrófilos maduros circulantes ni en los tejidos (Nauseef, 2018), hemos observado que, en la sangre del rodaballo, y también en algunos órganos, se produce algo de expresión, lo que indica que la *mpo* se expresa, aunque a un nivel bajo, en neutrófilos maduros. En otras especies de peces como *O. fasciatus* se ha encontrado alta expresión en neutrofilos sanguíneos (Elvitigala *et al.*, 2015), aún más elevada que en neutrófilos de rodaballo. Hemos observado además una elevada expresión de *mpo* en las branquias, un órgano rico en neutrófilos, y, en menor medida, en el bazo del rodaballo; en concordancia con lo observado en *E. coioides* (Wang *et al.*, 2018), lo que indica que los neutrófilos circulantes y los localizados en tejidos continúan expresando *mpo* en peces.

Mediante inmunofluorescencia hemos identificado con nuestro anticuerpo policlonal células peroxidasa-positivas en riñón, bazo, sangre y líquido peritoneal de rodaballo. Las células son muy abundantes en el riñón, donde forman grandes grupos, y más escasos en el bazo, donde aparecen dispersos. Las células marcadas presentan una morfología semejante a la de neutrófilos, similar a la encontrada mediante inmunohistoquímica en frotis de sangre de *E. coioides* (Wang *et al.*, 2018) o a los neutrófilos de sangre y riñón anterior de

rodaballo identificados por la tinción yoduro de potasio y pironina oxidada Y (Chi *et al.*, 2017). En el riñón anterior hemos observado una mayor cantidad de células Mpo-positivas con más variabilidad en el grado de tinción de los gránulos, a diferencia de lo que ocurre en sangre o bazo, debido a la presencia de células en distintos estados de maduración (Hine, 1992). En el líquido peritoneal también se observan células Mpo-positivas menos teñidas con características similares a macrófagos. Es sabido que los macrófagos de rata son capaces de internalizar MPO mediante el receptor de manosa presente en estas células (Shepher y Hoidal, 1990), por lo que algo similar puede ocurrir en el rodaballo.

El análisis filogenético realizado indica que la peroxidasa de neutrófilos de rodaballo presenta una mayor similitud con la peroxidasa de eosinófilos de otras especies de peces y de mamíferos. La MPO y la peroxidasa de eosinófilos pertenecen al grupo de las hemo peroxidases, y son estructuralmente y funcionalmente similares, con los sitios activos muy conservados (Furtmüller *et al.*, 2006; Loughran *et al.*, 2008). De hecho, se ha sugerido que ambas peroxidases se habrían generado por amplificación génica a partir de un gen ancestral común (Furtmüller *et al.*, 2006). La Mpo de rodaballo presenta un porcentaje de identidad del 51,14% con la peroxidasa de eosinófilos y del 49,86% con la MPO de humanos; lo que sugiere que la peroxidasa de neutrófilos de rodaballo es una peroxidasa de eosinófilos (EPO). Hemos rastreado el genoma de rodaballo buscando

otras secuencias de *mpo/epo*, pero no hemos encontrado ninguna. Buscando en las bases de datos, hay especies de peces que presentan las dos, otras solamente una. En algunos casos, hemos encontrado isoformas de cada una de ellas. Como en rodaballo no se han descrito eosinófilos (Burrows *et al.*, 2001), todo parece indicar que esta es la única peroxidasa presente en neutrófilos. Dado que en las bases de datos predomina claramente la EPO, la cual parece estar presente en casi todas las especies de peces analizadas, se podría pensar que la EPO sería la precursora de las peroxididasas de neutrófilos y eosinófilos. Sin embargo, cuando analizamos otros aspectos, como puede ser la formación de dímeros, la peroxidasa de neutrófilos de rodaballo se parece más a la MPO de mamíferos. Al igual que la MPO de mamíferos, la peroxidasa de rodaballo forma homodímeros, mientras que la EPO forma únicamente monómeros (Olsson *et al.*, 1985). Existen algunas diferencias funcionales entre la MPO y la EPO de mamíferos; sin embargo, hay muy pocos estudios sobre la función de estas peroxididasas en peces que nos ayuden a decantarnos en uno u otro sentido.

En humanos, la MPO puede unirse a neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) a través de las integrinas CD11b/CD18 y actuar como mediador autocrino en las funciones de los leucocitos, aumentando, por ejemplo, la translocación del factor NF- κ B (Lau *et al.*, 2005). Además de por la unión directa a la MPO, el NF- κ B también puede ser activado en las células T por el ácido hipocloroso

(HOCl) producido por la MPO en presencia de H₂O₂ (Schoonbroodt *et al.*, 1997). El NF- κ B es un mediador de respuestas inflamatorias, que aumenta la producción de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α), quimiocinas y moléculas de adhesión (Liu *et al.*, 2017). En nuestro ensayo de estimulación *in vitro* hemos observado una potente regulación positiva del gen de CD11b a las 24 horas del estímulo y una menor regulación positiva del gen de CD18, lo que sugiere que, al igual que lo que ocurre en humanos, en rodaballo la Mpo podría actuar por esta vía. Además, se ha encontrado regulación positiva de las citocinas proinflamatorias IL-12 β y TNF- α , pero no de la citocina antiinflamatoria IL-22, que es un miembro de la familia de las IL-10, y es producida por células T CD4⁺ activadas, células NK y macrófagos activados (Kim *et al.*, 2017). La IL-8 es una quimiocina que se produce en varios tipos celulares, incluidos monocitos, macrófagos o neutrófilos en respuesta a LPS, IL-1 β o TNF y actúa atrayendo neutrófilos y otras células en humanos (Marie *et al.*, 1999). En leucitos de riñon anterior de perca china, *Siniperca chuasti*, se ha observado *in vitro* un efecto quimioatrayente y activador de genes proinflamatorios (Wang *et al.*, 2017). En este caso, hemos observado que la IL-8 se estimula a las 24h del inicio del estímulo, concordando con la tendencia a la agregación celular que se observa en el cultivo.

El factor NF- κ B también promueve la polarización de las células T hacia respuestas Th1, o bien mediando la regulación del receptor de células T (TCR) o bien a través de la interleucina IL-12,

las cuales se caracterizan por la secreción de IFN γ (Liu *et al.*, 2017). Esto concuerda con nuestros resultados, ya que hemos observado sobreexpresión tanto del gen de la IL-12 β como del gen del IFN γ . Sin embargo, hemos observado infraexpresión del gen TCR a grandes concentraciones de Mpo. Otra de las interleucinas estudiadas es la IL-17, que en nuestro ensayo se sobrerregulada, lo cual parece concordar con el hecho de que es una citocina proinflamatoria producida por células T del linaje Th17 principalmente, aunque también por algunos neutrófilos y otras células y que brinda protección frente a patógenos extracelulares, actúa sobre ciertas quimiocinas (como IL-8) y provoca una rápida migración de neutrófilos (Curtis y Way, 2009).

Al igual que la Mpo, la peroxidasa de eosinófilos pertenece al grupo de las hemoperoxidasas que catalizan la oxidación dependiente de peróxido de hidrógeno de iones de haluro inorgánico y muchos compuestos orgánicos. Por lo tanto, ambas enzimas tienen actividades haloperoxidasa que son altamente microbicidas (Bozeman *et al.*, 1990). En los peces podemos encontrar los dos tipos de peroxidasas en distintas especies (ver Tabla 4), sin embargo, el rodaballo no tiene eosinófilos (Burrows *et al.*, 2001) y en nuestro estudio solo localizamos una peroxidasa que es más similar a la peroxidasa de eosinófilos de peces que a la MPO. Esta peroxidasa del rodaballo tendría características intermedias entre los dos tipos de peroxidasas y estaría localizada en los neutrófilos, realizaría las funciones que en otras especies de peces realizan los dos tipos de peroxidasas.

5. Bibliografía

- Aratani, Y. (2018). Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch. Biochem. Biophys.*, 640: 47-52. doi: 10.1016/j.abb.2018.01.004
- Arnhold, J., Flemmig, J. (2010). Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity. *Arch. Biochem. Biophys.*, 500(1): 92-106. doi: 10.1016/j.abb.2010.04.008
- Bennett, C.M., Kanki, J.P., Rhodes, J., Liu, T.X., Paw, B.H., Kieran, M.W., Langenau, D.M., Delahaye-Brown, A., Zon, L.I., Fleming, M.D., Look, A.T. (2001). Myelopoiesis in the zebrafish, *Danio rerio*. *Blood*, 98: 643-651. doi: 10.1182/blood.v98.3.643
- Blanco-Abad, V., Noia, M., Valle, A., Fontenla, F., Folgueira, I, De Felipe, A.P., Pereiro, P., Leiro, J, Lamas, J. (2018). The coagulation system helps control infection caused by the ciliate parasite *Philasterides dicentrarchi* in the turbot *Scophthalmus maximus* (L.). *Dev. Comp. Immunol.*, 87: 147-156. doi: 10.1016/j.dci.2018.06.001
- Bozeman, P.M., Learn, D.B., Thomas, E.L. (1990). Assay of the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. *J.Immunol.Methods*, 126: 125-133. doi: 10.1016/0022-1759(90)90020-v

- Bricker, N.K., Raskin, R.E., Densmore, C.L. (2012). Cytochemical and immunocytochemical characterization of blood cells and immunohistochemical analysis of spleen cells from 2 species of frog, *Rana (Aquarana) catesbeiana* and *Xenopus laevis*. *Vet. Clin. Pathol.*, 41(3): 353-361. doi: 10.1111/j.1939-165X.2012.00452.x
- Burrows, A.S., Fletcher, T.C., Manning, M.J. (2001). Haematology of the turbot, *Psetta maxima* (L.): ultrastructural, cytochemical and morphological properties of peripheral blood leucocytes. *J. Appl. Ichthyol.* 17: 77-84. doi: 10.1046/j.1439-0426.2001.00250.x
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.*, 55(4): 611-622. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797
- Bustin, S.A., Wittwer, C.T. (2017). MIQE: A Step Toward More Robust and Reproducible Quantitative PCR. *Clin. Chem.*, 63(9): 1537-1538. doi: 10.1373/clinchem.2016.268953
- Castro, R., Couso, N., Obach, A., Lamas, J., (1999). Effect of different β -glucans on the respiratory burst of turbot (*Psetta maxima*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) phagocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 9, 529–541. doi: 10.1006/fsim.1999.0210

- Castro, R., Lamas, J., Morais, P., Sanmartín, M.L., Orallo, F., Leiro, J. (2018a). Resveratrol modulates innate and inflammatory responses in fish leucocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 126(1-2): 9-19. doi: 10.1016/j.vetimm.2008.06.001
- Castro, R., Piazzon, M.C., Noya, M., Leiro, J.M., Lamas, J. (2008b). Isolation and molecular cloning of a fish myeloperoxidase. *Mol. Immunol.*, 45: 428-437. doi: 10.1016/j.molimm.2007.05.028
- Chen, X., Wei, Q., Wang, J., Peng, F., Li, E., Zhou, Y., Zhang, S. (2018). Cytochemical patterns of the peripheral blood cells in Chinese alligator (*Alligator sinensis*). *Tissue Cell.*, 55: 71-76. doi: 10.1016/j.tice.2018.10.004
- Chi, H., Wen, L.L., Sui, Z.H., Sun, Q.L., Sun, L. (2017). Cytochemical identification of turbot myeloperoxidase-positive granulocytes by potassium iodide and oxidized pyronine Y staining. *Tissue Cell*, 49 (6): 751-755. doi: 10.1016/j.tice.2017.10.008
- Couso, N., Castro, R., Noya, M., Lamas, J., (2001). Location of superoxide production sites in turbot neutrophils and gilthead seabream acidophilic granulocytes during phagocytosis of glucan particles. *Dev. Comp. Immunol.*25, 607–618. doi: 10.1016/s0145-305x(01)00019-2
- Cowland, J.B., Borregaard, N. (1999). The individual regulation of granule protein mRNA levels during neutrophil maturation

- explains the heterogeneity of neutrophil granules. *J. Leukoc. Biol.*, 66(6): 989-995. doi: 10.1002/jlb.66.6.989
- Curtis, M.M., Way, S.S. (2009). Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunol.*, 126: 177-185. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.03017.x
- de Araujo, T.H., Okada, S.S., Ghosn, E.E., Taniwaki, N.N., Rodrigues, M.R., de Almeida, S.R., Mortara, R.A., Russo, M., Campa, A., Albuquerque, R.C. (2013). Intracellular localization of myeloperoxidase in murine peritoneal B-lymphocytes and macrophages. *Cell Immunol.*, 281(1): 27-30. doi: 10.1016/j.cellimm.2013.01.002
- El Kebir, D., József, L., Pan, W., Filep, J.G. (2008). Myeloperoxidase delays neutrophil apoptosis through CD11b/CD18 integrins and prolongs inflammation. *Circ. Res.*, 103(4): 352-359. doi: 10.1161/01.RES.0000326772.76822.7a
- Elvitigala, D. A. S., Whang, I., Nam, B. H., Park, H. C., Lee, J. (2015). Identification of a myeloperoxidase-like ortholog from rock bream (*Oplegnathus fasciatus*), deciphering its transcriptional responses to induced pathogen stress. *Fish Shellfish Immunol.*, 45(2): 477-485. doi: 10.1016/j.fsi.2015.05.014
- Fiedler, T.J., Davey, C.A., Fenna, R.E. (2000). X-ray crystal structure and characterization of halide-binding sites of human

- myeloperoxidase at 1.8 Å resolution. *J. Biol. Chem.*, 275: 11964–11971. doi: 10.1074/jbc.275.16.11964
- Fontenla, F., Blanco-Abad, V., Pardo, B.G., Folgueira, I., Noia, M., Gómez-Tato, A., Martínez, P., Leiro, J.M., Lamas, J. (2016). Vaccine-induced modulation of gene expression in turbot peritoneal cells. A microarray approach. *Mol. Immunol.*, 75: 188-99. doi: 10.1016/j.molimm.2016.06.001
- Furtmüller, P.G., Zederbauer, M., Jantschko, W., Helm, J., Bogner, M., Jakopitsch, C., Obinger, C. (2006). Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases. *Arch. Biochem. Biophys.*, 445(2): 199-213. doi: 10.1016/j.abb.2005.09.017
- Genovese, K.J., He, H., Swaggerty, C.L., Kogut, M.H. (2013). The avian heterophil. *Dev. Comp. Immunol.*, 41(3): 334-340. doi: 10.1016/j.dci.2013.03.021
- Grishkovskaya, I., Paumann-Page, M., Tscheliessnig, R., Stampler, J., Hofbauer, S., Soudi, M., Sevcnikar, B., Oostenbrink, C., Furtmüller, P.G., Djinović-Carugo, K., Nauseef, W.M., Obinger, C. (2017). Structure of human promyeloperoxidase (proMPO) and the role of the propeptide in processing and maturation. *J. Biol. Chem.*, 292(20): 8244-8261. doi: 10.1074/jbc.M117.775031
- Guan, Y., Zhu, Q., Huang, D., Zhao, S., Lo, L.J., Peng, J. (2015). An equation to estimate the difference between theoretically

- predicted and SDS PAGE-displayed molecular weights for an acidic peptide. *Sci. Rep.* 5: 13370. doi: 10.1038/srep13370
- Hansson, M., Olsson, I., Nauseef, W.M. (2006). Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 445(2): 214-224. doi: 10.1016/j.abb.2005.08.009
- Harris, E.S., McIntyre, T.M., Prescott, S.M., Zimmerman, G.A. (2000). The leucocyte integrins. *J. Biol. Chem.*, 275(31): 23409-23412. doi: 10.1074/jbc.R000004200
- Harrison, J.E., Pabalan, S., Schultz, J. (1977). The subunit structure of crystalline canine myeloperoxidase. *Biochim. Biophys. Acta*, 493(2): 247-59. doi: 10.1016/0005-2795(77)90181-7
- Hine, P.M. (1992). The granulocytes of fish. *Fish Shellfish Immunol.*, 2: 79-98. doi: 10.1016/S1050-4648(05)80038-5
- Hine, P.M., Wain, J.M. (1988). Observations on the granulocyte peroxidase of teleosts: a phylogenetic perspective. *J. Fish Biol.* 33:247-254. doi: 10.1111/j.1095-8649.1988.tb05467.x
- Johansson, M.W., Patarroyo, M., Oberg, F., Siegbahn, A., Nilsson, K. (1997). Myeloperoxidase mediates cell adhesion via the $\alpha_M\beta_2$ integrin (Mac-1, CD11b/CD18). *J. Cell Sci.*, 110(9): 1133-1139.
- Klebanoff, S.J. (2005). Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leukoc. Biol.*, 77(5): 598-625. doi: 10.1189/jlb.1204697
- Kim, Y., Lee, J., Kim, J., Choi, C.W., Hwang, Y., Kang, J.S., Lee, W.J. (2017). The pathogenic role of interleukin-22 and its

- receptor during UVB-induced skin inflammation. PLoS One, 12(5): e0178567. doi: 10.1371/journal.pone.0178567
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Mol. Biol. Evol., 35(6): 1547-1549. doi: 10.1093/molbev/msy096
- Lau, D., Mollnau, H., Eiserich, J.P., Freeman, B.A., Daiber, A., Gehling, U.M. (2005). Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. PNAS, 102(2): 431-436. doi: 10.1073/pnas.0405193102
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., Sun, S. (2017). NF- κ B signaling in inflammation. Signal Transduction and Targeted Therapy 2, e17023. doi:10.1038/sigtrans.2017.23
- Loughran, N.B., O'Connor, B., O'Fágáin, C., O'Connell, M.J. (2008). The phylogeny of the mammalian heme peroxidases and the evolution of their diverse functions. BMC Evol. Biol., 8: 101. doi: 10.1186/1471-2148-8-101.
- Marie, C., Roman-Roman, S., Rawadi, G. (1999). Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in interleukin-8 production by human monocytes and polymorphonuclear cells stimulated with lipopolysaccharide or *Mycoplasma fermentans* membrane lipoproteins. Infect. Immun., 67(2): 688-693.

- Mathy-Hartert, M., Bourgeois, E., Grulke, S., Deby-Dupont, G., Caudron, I. (1997). Purification of myeloperoxidase from equine polymorphonuclear leucocytes. *Can. J. Vet. Res.*, 62: 127-132.
- Metzler, K.D., Fuchs, T.A., Nauseef, W.M., Reumaux, D., Roesler, J., Schulze, I., Wahn, V., Papayannopoulos, V., Zychlinsky, A. (2011). Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood*, 117(3): 953-959. doi: 10.1182/blood-2010-06-290171
- Morishita, K., Kubota, N., Asano, S., Kaziro, Y., Nagata, S. (1987). Molecular cloning and characterization of cDNA for human myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.*, 262(8): 3844-3851.
- Nauseef, W.M. (2018). Biosynthesis of human myeloperoxidase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 642: 1-9. doi: 10.1016/j.abb.2018.02.001
- Olsson, I., Persson, A.M., Strömberg, K., Winqvist, I., Tai, P.C., Spry, C.J. (1985). Purification of eosinophil peroxidase and studies of biosynthesis and processing in human marrow cells. *Blood*, 66(5): 1143-1148.
- Press, C.M., Evensen, Ø. (1999). The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish Shellfish Immunol.* 9, 309-318. doi: 10.1006/fsim.1998.0181
- Podok, P., Wang, H., Xu, L., Xu, D., Lu, L. (2014). Characterization of myeloid-specific peroxidase, keratin 8, and dual specificity phosphatase 1 as innate immune genes involved in the resistance

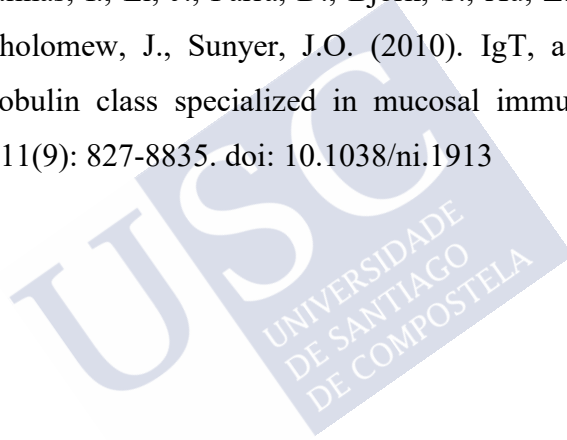
- of crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) to Cyprinid herpesvirus 2 infection. *Fish Shellfish Immunol.*, 41(2): 531-540. doi: 10.1016/j.fsi.2014.10.001
- Rose, A.B. (2019). Introns as gene regulators: a brick on the accelerator. *Front. Genet.* 9: 672. doi: 10.3389/fgene.2018.00672
- Salakij, C., Kasorndorkbua, C., Pornpanom, P., Salakij, J., Jakthong, P. (2019). Quantitative and qualitative characteristics of blood cells in black-shouldered, Brahminy, and black kites. *Vet. Clin. Pathol.*, 48(1): 19-30. doi: 10.1111/vcp.12691
- Schoonbroodt, S., Legrand-Poels, S., Best-Belpomme, M., Piette, J. (1997). Activation of the NF- κ B transcription factor in a T-lymphocytic cell line by hypochlorous acid. *Biochem. J.* 321: 777-785. doi: 10.1042/bj3210777
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.*, 3: 1101-1108. doi: 10.1038/nprot.2008.73
- Shepherd, V.L., Hoidal, J.R. (1990). Clearance of neutrophil-derived myeloperoxidase by the macrophage mannose receptor. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2: 335-340. doi: 10.1165/ajrcmb/2.4.335
- Singh, P.K., Iqbal, N., Sirohi, H.V., Bairagya, H.R., Kaur, P., Sharma, S., Singh, T.P. (2018) Structural basis of activation of mammalian heme peroxidases. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 133: 49-55. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2017.11.003

- Stanley, P. (2011). Golgi Glycosylation. In: Additional Perspectives on The Golgi. Graham Warren, G., Rothman, J. (Eds). Cold Spring Harb Perspect Biol 2011;3:a005199. doi: 10.1101/cshperspect.a005199
- van der Veen, B.S., de Winther, M.P.J., Heeringa, P. (2009). Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. Antioxid. Redox Signal, 11(11): 2899-2937. doi: 10.1089/ars.2009.2538.
- Vanhamme, L., Zouaoui Boudjeltia, K., Van Antwerpen, P., Delporte, C. (2018). The other myeloperoxidase: Emerging functions. Arch. Biochem. Biophys., 649: 1-14. doi: 10.1016/j.abb.2018.03.037
- Wang, G.L., Wang, M.C., Zhang, X.W., Chang, M.X., Xie, H.X., Nie, P. (2017). Molecular cloning, biological effect, and tissue distribution of interleukin-8 protein in mandarin fish (*Siniperca chuasti*) upon *Flavobacterium columnare* infection. Fish Shellfish Immunol., 66: 112-119. doi: 10.1016/j.fsi.2017.05.016.
- Wang, H.Q., Zhou, L.1., Yang, M., Luo, X.C., Li, Y.W., Dan, X.M. (2018). Identification and characterization of myeloperoxidase in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). Fish Shellfish Immunol., 72: 230-236. doi: 10.1016/j.fsi.2017.10.063
- Yeh, H.Y., Klesius, P.H. (2010). Sequence analysis, characterization and tissue distribution of channel catfish (*Ictalurus punctatus*

Rafinesque, 1818) myeloperoxidase cDNA. *Fish Shellfish Immunol.*, 28(3): 504-509. doi: 10.1016/j.fsi.2009.12.007

Zederbauer, M., Furtmüller, P.G., Brogioni, S., Jakopitsch, C., Smulevich, G., Obinger, C. (2007). Heme to protein linkages in mammalian peroxidases: impact on spectroscopic, redox and catalytic properties. *Nat. Prod. Rep.*, 24(3): 571-584. doi: 10.1039/b604178g

Zhang, Y.A., 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. *Nat. Immunol.* 11(9): 827-8835. doi: 10.1038/ni.1913



CAPÍTULO V

**DESARROLLO DE NUEVOS ADYUVANTES
PARA LA VACUNACIÓN DEL RODABALLO**

FRENTE A *Philasterides dicentrarchi*



Desarrollo de nuevos adyuvantes para la vacunación del rodaballo frente a *Philasterides dicentrarchi*

1. Introducción

Las vacunas, especialmente las basadas en microorganismos inactivados, no suelen ser lo suficientemente inmunogénicas para inducir una protección efectiva y de larga duración (Tafalla *et al.*, 2013). Para solucionar esta carencia, se emplean adyuvantes, que se definen como compuestos que son añadidos a una vacuna para modular la respuesta inmunogénica intrínseca de un antígeno (Tafalla *et al.*, 2013). La respuesta provocada por los antígenos y adyuvantes está ligada a la población de células T activadas. Las células T colaboradoras (Th) se caracterizan por presentar el marcador CD4. Estas células pueden diferenciarse a células Th1, relacionadas con la inmunidad celular, células Th2, relacionadas con la inmunidad humoral, u otros tipos celulares, tales como células Th17. Las células Th1 expresan el factor de transcripción TBX21 y secretan IFN γ , IL2 y TNF α , mientras que las células Th2 expresan el factor de transcripción GATA3 y secretan IL4, IL5 y IL13 (Romagnani, 1997, 1999). Durante la vacunación es importante controlar el perfil de polarización Th1/Th2 ya que, dependiendo del patógeno frente al cual se quiera conferir protección, es más conveniente estimular la respuesta celular o la respuesta humoral. Las respuestas Th1 se dan frente a patógenos intracelulares y las Th2 frente a parásitos extracelulares (Zhu y Paul,

2008). Los adyuvantes pueden modular el tipo de perfil Th1/Th2 producido en un organismo modificando la respuesta a un antígeno (McKee *et al.*, 2007; McKee y Marrack, 2017).

Los adyuvantes basados en hidróxido de aluminio son muy empleados en vacunas para mamíferos. A pesar de que hace años este adyuvante no estaba muy estudiado en peces (Tafalla *et al.*, 2013), recientemente se ha analizado la respuesta inmunitaria que induce en dorada (*Sparus aurata*) (Galindo-Villegas *et al.*, 2019), salmón (*Salmo salar*) (Hoare *et al.*, 2019), rodaballo (*Scophthalmus maximus*) (Fontenla *et al.*, 2016) o pez gato americano (*Ictalurus punctatus*) (Jiang *et al.*, 2015). Uno de los problemas asociados a los compuestos de aluminio es su incapacidad de producir una respuesta Th1 efectiva (Petrovsky, 2006) y, aunque produce una intensa respuesta humoral, no es un adyuvante efectivo en vacunas que requieren inmunidad mediada por células (Schijns y Lavelle, 2014).

El adyuvante completo de Freund (FCA) es un adyuvante oleoso que está formado por una emulsión de agua en un aceite mineral y la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* inactivada por calor (Opie y Freund, 1937; McKee y Marrack, 2017). Debido a sus numerosos efectos adversos, entre los que se incluyen abscesos necróticos y granulomas en el sitio de inyección, este adyuvante solo se emplea en investigación, a pesar de que induce una potente inmunidad celular y elevados títulos de anticuerpos (McKee y Marrack, 2017; Tafalla *et al.*, 2013). Sin embargo, no siempre este

adyuvante se asocia con un aumento de la protección frente al microorganismo en peces (Tafalla *et al.*, 2013).

En rodaballo, el FCA y el hidróxido de aluminio provocan un aumento significativo de la concentración de IgM específica a tiempos cortos en respuesta a una vacunación con antígeno particulado de *Philasterides dicentrarchi* y son capaces de inducir la activación de genes relacionados con la adhesión celular y señales pro y antiapoptóticas (Fontenla *et al.*, 2016). También el adyuvante oleoso Montanide ISA 763A VG administrado en vacunas ha generado un aumento en los niveles de IgM específica en rodaballo, induciendo un incremento en la protección frente a *P. dicentrarchi* (Sanmartín *et al.*, 2008; Lamas *et al.*, 2008). A pesar de estar bien documentada la importancia de la inmunidad humoral en la resistencia del rodaballo al parásito ciliado *P. dicentrarchi* (Piazzon *et al.*, 2011) y que los adyuvantes basados en aluminio son inductores de respuestas Th2 (Grun y Maurer, 1989; Brewer *et al.*, 1996; Hjertner *et al.*, 2018), no existen vacunas frente al mismo basadas en estos compuestos. En vacunas empleadas en peces se usa extensamente el adyuvante oleoso Montanide por su alta capacidad para inducir una protección efectiva frente patógenos (Tafalla *et al.*, 2013), pero, al ser un adyuvante oleoso, también produce numerosos efectos adversos como granulomas, retardo en el crecimiento o adhesiones de los órganos internos, aumentando el estrés al que se ve sometido el pez tras la

vacunación (Mutoloki *et al.*, 2004; Jaafar *et al.*, 2015; Noia *et al.*, 2014).

Actualmente, existe la necesidad de desarrollar adyuvantes sin los efectos negativos que tienen algunos, tales como el FCA (Petrovsky, 2006; Tafalla *et al.*, 2013; McKee y Marrack, 2017) o el Montanide (Mutoloki *et al.*, 2004; Jaafar *et al.*, 2015; Noia *et al.*, 2014;). En peces, se han elaborado vacunas con nuevos adyuvantes basados en polímeros biodegradables, tales como microsferas de quitosano (León-Rodríguez *et al.*, 2013) o las derivadas de polímeros biodegradables derivados de los ácidos láctico y glicólico (PLGA) (Behera *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2017) con buenos resultados en ensayos de protección. El quitosano es un polisacárido natural obtenido mediante la desacetilación parcial de la quitina de crustáceos, insectos y algunos microorganismos. Este polisacárido es biodegradable, biocompatible, no presenta toxicidad, siendo además un potente inmunoestimulante (Ji *et al.*, 2015) que, administrado en dietas, ha mejorado la resistencia frente a microorganismos en peces (Siwicki *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 2011; Cui *et al.*, 2013; Xia *et al.*, 2019). Como adyuvante, el quitosano se ha empleado en distintas formulaciones de vacunas para peces, alcanzando unos elevados niveles de protección en pez cebra (Liu *et al.*, 2015; Kavaliauskis *et al.*, 2015), rodaballo (León-Rodríguez *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2015) o *Siniperca chuatsi* (Zhang *et al.*, 2019). Se ha propuesto que el mecanismo por el cual el quitosano tiene esta capacidad de

estimulación es mediante la inducción de la producción de interferones de tipo 1 por la vía cGAS–STING, los cuales actúan activando las células dendríticas, lo cual lleva a una respuesta de tipo celular Th1 (Carroll *et al.*, 2016). Otros, sin embargo, han determinado que las nanoesferas de quitosano provocan una respuesta mixta Th1/Th2 en ratones inmunizados subcutáneamente con ovoalbúmina (Wen *et al.*, 2011). Curiosamente, la quitina, la forma acetilada del quitosano, induce una respuesta de tipo Th2, por lo que es relevante el grado de desacetilación del quitosano empleado para poder modular el tipo de respuesta inducida (Riteau y Sher, 2016). En peces, se ha observado que las microesferas de quitosano tienen la capacidad de estimular la capacidad fagocítica de leucocitos de riñón anterior de rodaballo, aumentando además la expresión de TNF- α en estas células (León-Rodríguez *et al.*, 2013).

La carboximetilcelulosa (CMC) es un polímero natural biocompatible y soluble en agua (Miyamoto *et al.*, 1989). Debido a esto, su empleo como sistema de liberación de fármacos ha sido bastante estudiado (Barbucci *et al.*, 2004; Reeves *et al.*, 2010). La CMC se ha empleado muy ocasionalmente como adyuvante en alguna vacuna en mamíferos, pero, hasta donde sabemos, no en peces. Por ejemplo, una vacuna intranasal formulada con CMC genera unos niveles de anticuerpos y una respuesta celular superior a la vacuna sin CMC en vacunaciones en ratones con una vacuna de ADN que

codificaba genes del virus de la inmunodeficiencia humana adquirida de tipo 1 (Hamajima *et al.*, 1998).

En estudios previos de nuestro grupo se ha observado la capacidad del ulvano, polisacárido sulfatado obtenido de *Ulva rigida*, de estimular el sistema inmunitario innato de rodaballo (Castro *et al.*, 2006). Además, en pollo es capaz de estimular la liberación de citocinas proinflamatorias por los monocitos y heterófilos a través de los TLR 2 y TLR 4 (Guriec *et al.*, 2018).

En base a estos estudios previos, en este trabajo se han desarrollado nuevos adyuvantes basados en polímeros de polisacáridos tales como la carboximetilcelulosa, el ulvano o el quitosano y se ha determinado el tipo de respuesta que producen en ratones cuando son administrados con antígeno particulado de *P. dicentrarchi*. Asimismo, se han diseñado vacunas experimentales para rodaballo frente al ciliado *P. dicentrarchi* y se han determinado tanto el nivel de IgM específicas frente al mismo producido por la vacuna, como la protección inducida frente a infecciones experimentales. Hemos desarrollado un adyuvante basado en ulvano y quitosano que ha producido una buena respuesta a nivel de IgM específica y de protección tras una infección experimental.

2. Material y métodos

2.1. Animales de experimentación

Todos los protocolos experimentales realizados en el presente estudio siguieron la legislación europea (Directiva 2010/63 / UE) y los requisitos legislativos españoles relacionados con el uso de animales para experimentación (RD 53/2013) y fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Santiago de Compostela.

2.1.1. Peces

Los rodaballos, de aproximadamente 60 g de peso, se obtuvieron de una piscifactoría local y se transfirieron al acuario de la Universidad de Santiago de Compostela, donde se aclimataron en tanques de 250 l de agua marina en recirculación a 16 °C, alimentándose diariamente con piensos comerciales. En otro experimento, los peces se mantuvieron en una piscifactoría local, donde se alimentaron con piensos comerciales. Los peces se anestesiaron por inmersión en una disolución 100 mg/l de triclaína metano sulfonato (MS-222) (Sigma-Aldrich) en agua de mar. La eutanasia se llevó a cabo mediante decapitación.

2.1.2. Ratones

Se emplearon ratones (*Mus musculus*) de la cepa IRC (Swiss) CD-1 obtenidos de Charles River Laboratories (Estados Unidos), y

criados en el Animalario Central de la Universidad de Santiago de Compostela. La eutanasia se administró por decapitación.

2.2. Extracción de ulvano

El ulvano se extrajo siguiendo una modificación de los protocolos descritos por Robic *et al.* (2009), Costa *et al.* (2012) y Yaich *et al.* (2013). Las algas verdes (*Ulva rigida*) se obtuvieron en los meses de mayo y junio en playas de la zona de Sada, A Coruña. Las algas se lavaron minuciosamente y se secaron a temperatura ambiente durante 24 horas, tras lo cual se introdujeron en una estufa con ventilación durante 24-48 horas a 50 °C. Posteriormente, las algas se picaron con un triturador de cuchillas y se guardaron a 4 °C. A la muestra se le añadió etanol de 70°, se hirvió durante 1 hora con agitación y se le añadió más etanol para compensar la evaporación. Posteriormente, esta se centrifugó a 12000 g durante 15 min, tras lo cual se retiró el sobrenadante y se conservó el precipitado, consistente en una pasta húmeda, que se disolvió en etanol de 70° y se dejó durante 16 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, la muestra se precipitó centrifugando a 12000 g durante 15 minutos. El precipitado se disolvió de nuevo en etanol y se dejó a temperatura ambiente durante 8 horas, con agitación. Este proceso se repitió dos veces más, tras lo cual la muestra se disolvió en etanol 96° y se secó en una estufa de 50 °C hasta el secado de la muestra, tras lo que se obtuvo un polvo llamado residuo insoluble en alcohol (RIA). El RIA

se disolvió en agua Mili-Q en una proporción de 3 l de agua por cada 100 g de RIA y se calentó durante 7 horas a 80 °C durante las que se le realizaron tres filtrados con filtros de tejido de algodón. Posteriormente, se realizaron filtraciones sucesivas por filtros de papel Watman de 22 μm , 11 μm , 8 μm , 6 μm , 1,5 μm e 0,8 μm de poro. La suspensión obtenida se incubó a 40 °C durante 2 h con α -amilasa. Se añadió 0,25 μl de la solución salina de Sigma (A3403) por cada 1000 μl de extracto. Posteriormente, se descartó la presencia de almidón añadiendo una gota de yoduro de potasio (5 g/l) en unas gotas del filtrado. El líquido se trató con proteinasa K a una concentración de 70-140 μl de proteinasa por cada litro de extracto, incubando a 37 °C durante 2 horas. Posteriormente, se añadieron 4 g/l carbón activado al extracto y se incubó a temperatura ambiente 24 horas. Finalmente, se centrifugó a 12500 g durante 15 minutos, obteniéndose un precipitado de carbón activado y un sobrenadante que se filtró a través de un filtro de 0,8 μm de poro. El extracto obtenido se diluyó en etanol absoluto (1:3) y se centrifugó a 6300 g durante 15 min. Se realizaron dos lavados sucesivos con etanol 50° y etanol 75°, centrifugando a 12500 g durante 10 minutos. Posteriormente, se recogió el precipitado en etanol 100° y se secó en una estufa 40 °C hasta su completo secado. Por último, el precipitado se molió con un molino de bolas y el ulvano se guardó a -20 °C.

2.3. Elaboración de adyuvantes

2.3.1. Gel de ulvano

La solución salina para la formación del gel de ulvano se preparó según los protocolos modificados de Haug (1976) y Lahaye y Robic (2007). Se preparó una solución salina de H_3BO_3 20 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 7mM, a doble concentración (2X), en agua destilada. El ulvano se disolvió al 2% (p/v) y 3% (p/v) en agua destilada y se mezcló con las soluciones salinas 2X. Posteriormente, se dejó a temperatura ambiente durante 30 min para obtener un gel de ulvano al 1% (p/v) y 1,5 % (p/v), respectivamente.

2.3.2. Ulvano metacrilatado

El protocolo empleado para la elaboración de ulvano metacrilatado (UM) es una variación del empleado por Morelli y Chiellini (2010). En primer lugar, 1 g de ulvano se disolvió en 20 ml de agua destilada, en agitación y a temperatura ambiente durante 1 h, y a 4°C durante toda la noche. La disolución resultante se hizo reaccionar a temperatura ambiente con 28 g de anhídrido metacrílico (Sigma-Aldrich), siendo añadido este último gota a gota. El pH se mantuvo aproximadamente en 8, mediante la adición secuencial de 40 ml de una solución de NaOH 3,3 N a 4 °C, durante el tiempo necesario para agotar dicha solución. El UM se purificó por precipitación en etanol absoluto (10:1 v/v) dos veces. En la primera el precipitado se recuperó mediante centrifugación a 5000 g. En la segunda purificación, el UM se dejó precipitando durante 24 h, tras las cuales

se recuperó el precipitado mediante filtración. Posteriormente, el precipitado se lavó 3 veces en dietil éter (Sigma-Aldrich) y se dejó secar a 37 °C durante 24 h. El producto resultante se disolvió en agua destilada y se dializó exhaustivamente en una tripa de diálisis frente a agua destilada durante 48 h a 4°C. Finalmente, el producto obtenido se liofilizó.

2.3.3. Carboximetilcelulosa metacrilatada

Para la elaboración de este adyuvante se siguió el protocolo descrito por Reza y Nicoll (2010). Se disolvió 1 g de CMC (Sigma-Aldrich) en 100 ml de agua destilada, a 50°C con agitación, hasta la completa disolución de la CMC. Posteriormente, la disolución se dejó en agitación durante 1 h a temperatura ambiente y a 4°C durante 48 horas. La disolución resultante de CMC al 1% se hizo reaccionar con 20 g de anhídrido metacrílico (Sigma-Aldrich) durante 24 h, con 11 ajustes a pH 8 cada hora y un ajuste final 12 horas después, los cuales se llevaron a cabo con NaOH 3 N. El producto resultante se dializó exhaustivamente frente a agua destilada durante 72 h a 4 °C y, finalmente, liofilizó

2.3.4. Hidrogel de ulvano-quitosano a

El hidrogel de ulvano-quitosano a (UQa) se elaboró siguiendo el protocolo descrito por Kanno *et al.* (2012). Brevemente, se mezclaron dos disoluciones precalentadas a 80 °C de ulvano 1,5%

(p/v) y quitosano (Sigma-Aldrich) 1,5% (p/v) en agua destilada. A la mezcla resultante se le añadió un 5% de ácido acético. Se dejó durante 20 horas a 20 °C, tras lo que se lavó tres veces con agua destilada, se dializó exhaustivamente en una tripa de diálisis y se liofilizó. El producto resultante se trituró con un mortero.

2.3.5. Hidrogel de ulvano-quitosano b

El hidrogel de ulvano y quitosano b (UQb) se elaboró según una modificación del protocolo de Barua y Das (2016). En 100 ml de agua destilada el ulvano y el quitosano (Sigma-Aldrich) se disolvieron al 1% (p/v). Posteriormente, se añadió ácido acético al 2% (v/v) a la disolución y, seguidamente, tripolifosfato sódico (Sigma-Aldrich) al 10% (p/v). Se dejó la solución resultante en agitación durante 1 hora a 40 °C, mientras se mantuvo el pH a 5,5. El producto resultante se precipitó tres veces con acetona y se dejó a secar a 50 °C en una estufa, tras lo cual se liofilizó.

2.4. Capacidad de inducción del estallido respiratorio en leucocitos de riñón anterior

La producción intracelular de O_2^- se midió empleando el método del nitroazul de tetrazolio (NBT). Con el objetivo de evaluar la capacidad inmunoestimulante de los adyuvantes desarrollados, los leucocitos de riñón anterior de rodaballo se obtuvieron según el protocolo descrito por Castro et al. (2006) y se incubaron por

triplicado durante 1 hora a 18 °C con los adyuvantes CM, UM o UQb (1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625 y 0,031 mg/ml en L-15) y NBT (Sigma-Aldrich) (1 mg/ml) en medio L-15 (Leibovitz) (Sigma-Aldrich) suplementado con 5% de suero fetal bovino (FBS) (Sigma-Aldrich). Se empleó como control positivo el forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) (Sigma-Aldrich) a 1µg/ml. Posteriormente, el sobrenadante se descartó y las células se fijaron con metanol. Posteriormente, el formazán reducido se solubilizó añadiendo 120 µl de KOH 2M y 140 µl de DMSO (Sigma-Aldrich). La reducción del NBT se cuantificó en un lector de placas modelo 680 (Bio-Rad), a una longitud de onda de 630 nm.

2.5. Cultivo *P. dicentrarchi*, extracción del antígeno de membrana y preparación del antígeno particulado

El parásito *P. dicentrarchi* (aislado I1) se obtuvo a partir del líquido ascítico de rodaballos infectados de forma natural y mantenidos y cultivados en el laboratorio, según lo descrito previamente por Piazzon *et al.* (2008). Para la obtención del antígeno particulado los ciliados se lavaron 3 veces en PBS centrifugando a 700 g, tras lo que se lisaron por sonicación en tampón PBS en un sonicador Branson ultrasonically W-250 (Branson Ultrasonic Corporation). La concentración de la proteína se determinó por el método Bradford (Bio-Rad Protein Assay kit, Bio-Rad), con BSA (Sigma-Aldrich) como estándar.

2.6. Inmunizaciones

Se realizó un estudio comparando los adyuvantes FCA e hidróxido de aluminio, y los adyuvantes desarrollados en este trabajo. Se inyectaron ratones intraperitonealmente con ulvano metacrilatado (UM), carboximetilcelulosa metacrilatada (CM), adyuvante completo de Freund (FCA) (Sigma-Aldrich) e hidróxido de aluminio al 2% (alhydrogel®; alum) (InvivoGen) y, como antígenos, se emplearon ovoalbúmina (OVA) (Sigma-Aldrich) o antígeno particulado de *P. dicentrarchi* (Ph). Los ratones se dividieron en 12 grupos de 11 ratones cada uno y se inyectaron con 100 µl de preparación vacunal. Los grupos fueron PBS, Ph (solo antígeno particulado de *P. dicentrarchi*), OVA (solo antígeno OVA) PhAlum (alum y antígeno particulado de *P. dicentrarchi*), PhFCA (FCA y antígeno particulado de *P. dicentrarchi*), PhCM (CM y antígeno particulado de *P. dicentrarchi*), PhUM (UM y antígeno particulado de *P. dicentrarchi*), OVAAlum (alum y OVA), OVAFCA (FCA y OVA), OVACM (CM y OVA), OVAUM (UM y OVA). La cantidad de antígeno se ajustó a 200 µg/ratón en todos los grupos con OVA o Ph. El FCA y el alum se usaron en una proporción 50:50 (v/v) y la CM y el UM se usaron a la concentración de 2 mg/animal. El FCA se emulsionó pasándolo repetidamente a través de una aguja para emulsiones. Se muestreó un grupo adicional de 9 ratones no inyectados a cuyo grupo se llamó T₀. De los 9 ratones por grupo, se cogieron 3 de cada tratamiento a los 1 y 3 días después de la inyección

y se les extrajeron las células peritoneales libres mediante lavado con 1 ml de PBS frío. Las células peritoneales se centrifugaron a 400 g durante 10 min a 4 °C y se congelaron en nitrógeno líquido, tras lo que se almacenaron a -80 °C. A los 5 ratones restantes de cada grupo, se les administró una dosis de refuerzo a los 15 días y se les extrajo la sangre tras otros 15 días (30 de la primera inmunización) por punción en el plexo retrobulbar venoso. Esta se dejó coagular durante 2 horas a temperatura ambiente y toda la noche a 4 °C, tras lo que se centrifugó a 3000 g durante 10 min. El suero se diluyó en glicerol 1:1 (v/v) y se guardó a -20 °C.

Ocho grupos de peces (30 peces por grupo) se inyectaron intraperitonealmente, a los días 0 y 30, con 100 µl de uno de los siguientes tratamientos: PBS, Ph (Antígeno particulado *P. dicentrarchi*), Mont (Montanide ISA 763 A (Seppic), CM (CM sin antígeno), UM (UM sin antígeno), VacMont (Montanide con antígeno 70:30), VacCM (CM con antígeno) y VacUM (UM con antígeno), en una piscifactoría local sin control de temperatura del agua. Las concentraciones de antígeno se ajustaron a 230 µg/pez y las de CM y UM a 2 mg/pez. El Montanide se emulsionó en PBS, en el caso del grupo Mont, y en PBS con antígeno, en el caso del grupo VacMont (70:30), pasándolo repetidamente por una aguja para emulsiones. A los 30 días de la segunda inmunización, se les extrajo la sangre por punción de la vena caudal. Esta se dejó coagular durante 2 horas a temperatura ambiente y toda la noche a 4 °C, tras lo que se centrifugó

a 3000 g durante 10 min. El suero se diluyó en glicerol 1:1 (v/v) y se guardó a -20 °C.

Tres grupos de peces (40 peces por grupo) se inyectaron intraperitonealmente, a los días 0 y 30, con 100 µl de uno de los siguientes tratamientos: PBS, una emulsión 50:50 de Montanide ISA 763 A (Seppic, Francia) en PBS o con el hidrogel de ulvano-quitosano b (20 mg/ml) en PBS. En la vacuna con Montanide se empleó antígeno entero inactivado con 0,1 % de formalina de *P. dicentrarchi* a una concentración de 10^5 ciliados por pez, según lo descrito por Lamas *et al.* (2008). En el grupo quitosano-ulvano b se empleó antígeno particulado de *P. dicentrarchi* ajustado a 230 µg por pez. A los 30 días de la segunda inmunización, se les extrajo la sangre por punción de la vena caudal. Esta se dejó coagular durante 2 horas a temperatura ambiente y toda la noche a 4 °C, tras lo que se centrifugó a 3000 g durante 10 min. El suero se diluyó en glicerol 1:1 (v/v) y se guardó a -20 °C.

2.7. Infección experimental de rodaballos con *P. dicentrarchi*

Se llevó a cabo una infección experimental en rodaballos a los 30 días de la segunda inyección, utilizando 20 peces por grupo. Para la infección, los peces se inyectaron intraperitonealmente con 100 µl de ciliados en PBS (10^6 ciliados/ml). La mortalidad se siguió durante 16 días y se expresó como mortalidad acumulada. El porcentaje relativo de supervivencia (RPS) se determinó con la siguiente fórmula:

$$RPS = 1 - \frac{\text{mortalidad grupo vacuna}}{\text{mortalidad en grupo control}} \times 100$$

2.8. Extracción de ARN y cuantificación de la expresión génica en células peritoneales libres de ratón mediante qPCR

El ARN de las células peritoneales se extrajo y el ADNc se sintetizó, con ligeras modificaciones, según lo descrito anteriormente (Fontenla *et al.*, 2016). Resumiendo, el ARN se extrajo utilizando el método del TRI Reagent® (Sigma-Aldrich), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN resultante se secó, se disolvió en agua libre de ARNasas y se cuantificó en un espectrofotómetro Nano Drop ND-1000 (NanoDrop). El ARN total se trató con ADNasa I (Thermo Scientific) para eliminar la posible contaminación con ADN genómico. La síntesis del ADNc se realizó con 20 ng/μL de hexanucleótidos aleatorios (Nzytech, Portugal), 0,5 mM de cada nucleósido trifosfato (dNTP) (Nzytech), 20 U de inhibidor de ribonucleasas (Nzytech), 200 U de M-MuLV Reverse Transcriptase (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. 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 40 ciclos de incubación (10 s a 95 °C y 30 s a 60 °C) y un ciclo de disociación consistente en 15 s a 95 °C, 15 s a 55 °C y 15 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). El tamaño y la especificidad de los productos de PCR se comprobaron en un gel de agarosa al 2%. La expresión normalizada de los genes se determinó por el método CT comparativo (Schmittgen y Livak, 2008) mediante software, de acuerdo a las guías de la mínima información para la publicación de experimentos de RT-qPCR (Bustin *et al.*, 2009; Bustin y Wittwer, 2017). La beta actina se empleó como gen constitutivo. Los mapas de calor se elaboraron con el software MultiExperiment Viewer (MeV) 4.9.

Cebadores	Secuencia (5'→3')	Número de acceso
<i>Actb</i> (directo)	TGTTACCAACTGGGACGACA	EF095208
<i>Actb</i> (reverso)	GGGGTGTGAAGGTCTCAA	EF095208
<i>Tbx21</i> (directo)	AGCAAGGACGGCGAATGT	NM_019507
<i>Tbx21</i> (reverso)	GGGTGGACATATAAGCGGTTC	NM_019507
<i>Gata3</i> (directo)	TATGTGCCCCGAGTACAGCTC	XM_030247532
<i>Gata3</i> (reverso)	CTCCCTGCCTTCTGTGCT	XM_030247532
<i>Ifng</i> (directo)	TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA	NM_008337
<i>Ifng</i> (reverso)	TGGCTCTGCAGATTTTCAT	NM_008337
<i>Il4</i> (directo)	ACAGGAGAAGGGACGCCAT	NM_021283
<i>Il4</i> (reverso)	GAAGCCCTACAGACGAGCTCA	NM_021283

Tabla 1. Secuencias específicas de cebadores para qPCR. *Actb*: beta actina; *Tbx21*: factor de transcripción caja T 21; *Gata3*: : proteína 3 de unión a la secuencia de ADN GATA; *Ifnγ*: interferón γ ; *Il4*: interleucina 4.

2.9. Determinación de anticuerpos específicos mediante ELISA en suero de ratón

Los niveles de anticuerpos específicos totales contra antígeno de *P. dicentrarchi* se estimaron mediante ELISA indirecto, según el protocolo descrito por Iglesias *et al.* (1993). Los anticuerpos específicos IgG_{2a} e IgG₁ se determinaron mediante una ligera modificación del protocolo anterior.

En resumen, placas de ELISA de 96 pocillos (IWAKI) se tapizaron con 10 $\mu\text{g/ml}$ de antígeno particulado de *P. dicentrarchi* en tampón carbonato-bicarbonato (pH 9,6) e incubaron toda la noche a 4 °C. Los pocillos se lavaron 5 veces con TBS (50 mM Tris, 0,15 M NaCl, pH 7,4) con 0,05% de Tween 20 (Sigma-Aldrich) (TBS-T₂), y se bloquearon durante 1 h a 37 °C con TBS con 0,2 % de Tween (TBS-T₁) y 5% de leche desnatada en polvo, tras lo que se lavaron 5 veces con TBS-T₂. Posteriormente, las placas se incubaron con una dilución 1:2000 de suero de ratón en TBS-T₁ con 1% de leche desnatada, en un agitador de placas durante 30 min, a temperatura ambiente, y lavados 5 veces con TBS-T₂. Para la detección de los anticuerpos de ratón, se añadió uno de los siguientes anticuerpos secundarios: policlonal de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón/HRP (Dako, Dinamarca) en el caso de los anticuerpos específicos totales; cabra anti-ratón IgG_{2a}-HRP (Santa Cruz

Biotechnology, EEUU), en el caso de los anticuerpos específicos IgG_{2a}, o cabra anti-ratón IgG₁-HRP (Santa Cruz Biotechnology), en el caso de los anticuerpos específicos IgG₁, a una dilución 1:1000 en TBS-T₁ con 1% de leche desnatada. Las muestras se incubaron en un agitador de placas durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras los 5 lavados finales, se añadió 100 µl de o-fenilenediamina (Sigma-Aldrich) al 0,04% en tampón citrato, pH 5, con 0,0001% de H₂O₂, en cada pocillo. La reacción se detuvo a los 20 minutos mediante la adición de H₂SO₄ 3N. La densidad óptica se midió a 490 nm en un lector de placas ELISA (Titertek multiscan, Flow Laboratories).

2.10. Determinación de IgM específicas mediante ELISA en suero de rodaballo

El nivel de la IgM específica contra *P. dicentrarchi* se midió mediante ELISA doble indirecto, de acuerdo a lo descrito previamente (Lamas *et al.*, 2008), con modificaciones menores. En resumen, las placas de ELISA de 96 pocillos (IWAKI) se tapizaron con 10 mg/ml de antígeno particulado de *P. dicentrarchi* en tampón carbonato-bicarbonato 0,05 M (pH 9.6), e incubaron toda la noche a 4 °C. Las placas se lavaron tres veces con TBS-T₂ y se bloquearon durante 1 h a 37 °C con TBS-T₁ y 5% de leche. A continuación, se lavaron 5 veces con TBS-T₂. Posteriormente, se incubaron 1 h a temperatura ambiente con 100 ml de una dilución de TBS-T₁ con 1% de leche desnatada a la que se le añadió suero de rodaballo, tras lo cual se lavaron 5 veces con

TBS-T₂. Para la detección de la IgM específica, se utilizó anti-IgM de rodaballo hecho en ratón (UR3) (Estévez *et al.* 1994), diluido 1:400 en TBS-T₁ con 1% de leche desnatada en polvo, y se incubó durante 1 h temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron 5 veces con TBS-T₂ y se incubaron con una dilución de anticuerpo conejo anti-ratón marcado con peroxidasa (1:1000) (Dako), durante 30 min a temperatura ambiente en TBS-T₁. Después de 10 lavados en TBS-T₂, se añadieron 50 ml de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Sigma-Aldrich) a cada pocillo y se incubó la placa durante 20 min a temperatura ambiente. La reacción se paró con 50 µl de H₂SO₄ 2 M por pocillo y la densidad óptica se midió a 450 nm en un lector de placas modelo 680 (Bio-Rad).

2.11. Análisis estadístico

Los datos se expresan como media ± desviación estándar. La significación estadística se determinó mediante análisis de la varianza (ANOVA), seguido de un test post-hoc de Tukey para la comparación múltiple. En el ensayo de la infección experimental se emplearon los test Kaplan–Meier y de Mantel-Cox (IBM SPSS Statistics ver. 21) para determinar las diferencias en las ratios de supervivencia, comparando las mortalidades en los grupos. Las diferencias se consideraron significativas con $p < 0,05$ o $p < 0,01$.

3. Resultados

3.1. Adyuvantes

En todos los adyuvantes, se comprobó su capacidad para disolverse en PBS, a un máximo de 40 mg/ml, y para pasar por las agujas comúnmente empleadas en vacunación de rodaballos (21 G). También se determinó su integridad una vez realizada la vacuna. El gel de ulvano mostró una buena gelificación, pero se descartó por presentar problemas de integridad a pH fisiológico. El UQa fue descartado por su incapacidad para disolverse totalmente en PBS, con los problemas de dosificación que esto conlleva. Los demás adyuvantes, esto es: carboximetilcelulosa metacrilatada, ulvano metacrilatado y ulvano-quitosano b demostraron disolverse fácilmente en PBS, ser inyectables y presentar estabilidad estructural, por lo que se seleccionaron para ser empleados en los experimentos con ratones y rodaballos.

3.2. Actividad estallido respiratorio en leucocitos de rodaballo

Los tres adyuvantes testados (CM, UM y UQb) son capaces de estimular la producción de especies reactivas del oxígeno. De las tres formulaciones probadas, el UQb presentó la mayor capacidad de inducir el estallido respiratorio (a concentraciones superiores a 0,065 mg/ml), seguido por el UM (a concentraciones superiores a 0,25). La CM apenas indujo estimulación de esta respuesta, siendo necesario

utilizar concentraciones de 1 mg/ml para observar cambios en la actividad (Fig. 1).

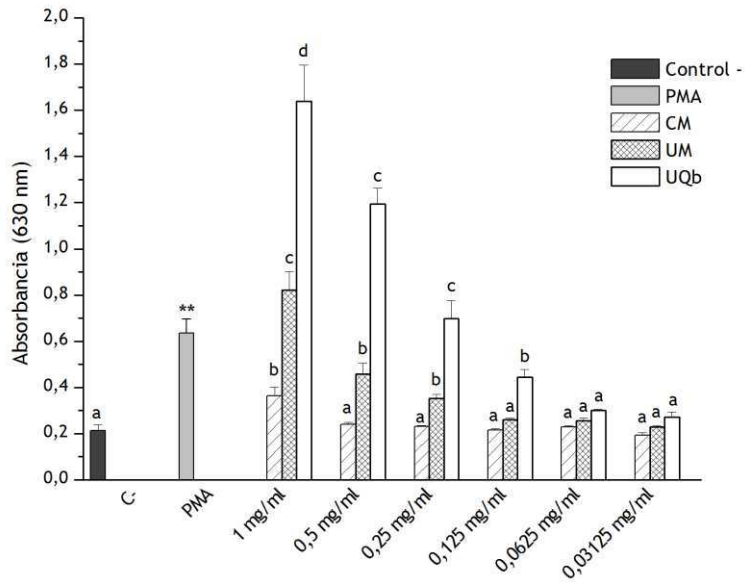


Fig. 1. Reducción de NBT obtenida al incubar leucocitos de riñón anterior de rodaballo con distintos adyuvantes o con PMA (control positivo). C-: control negativo; CM: carboximetilcelulosa metacrilatada; UM: ulvano metacrilatado; UQb: hidrogel de ulvano-quitosano b. Los datos se muestran como media \pm desviación estándar (n=3). Los asteriscos (**) indican diferencias significativas con el grupo control (C-) con $p < 0,05$. Las letras indican diferencias significativas con respecto al C- para cada concentración de adyuvante ($p < 0,05$).

3.3. Nivel de anticuerpos específicos y perfil Th1/Th2 en ratones inmunizados con antígeno y adyuvante UM o CM

En este experimento empleamos hidróxido de aluminio y adyuvante completo de Freund, como controles positivos para respuestas Th2 y Th1, respectivamente. El análisis del nivel de inmunoglobulinas en suero se ha empleado como un indicador de la capacidad inmunogénica de un antígeno y, por lo tanto, de la potencialidad para modular el sistema inmunitario adquirido para conseguir una adecuada protección frente a un patógeno concreto. La carboximetilcelulosa metacrilatada mostró toxicidad aguda en los ratones inyectados, produciéndose una elevada mortalidad entre 5 y 9 días después de la inyección. Por este motivo, sus niveles de anticuerpos no aparecen reflejados en las Figs. 2, 3 y 4. Los ratones inyectados con antígeno mostraron un nivel de IgGs totales significativamente mayor que los inyectados con PBS. Además, los grupos inyectados con adyuvante y antígeno mostraron un nivel de IgGs totales superior a sus respectivos grupos sin adyuvante (Fig. 2). El alum indujo un mayor nivel de anticuerpos específicos para Ph que el UM y el FCA, los cuales no mostraron diferencias significativas (Fig. 2). Asimismo, el FCA indujo una respuesta significativamente mayor que el Alum y que el UM cuando el antígeno empleado fue OVA (Fig. 2).

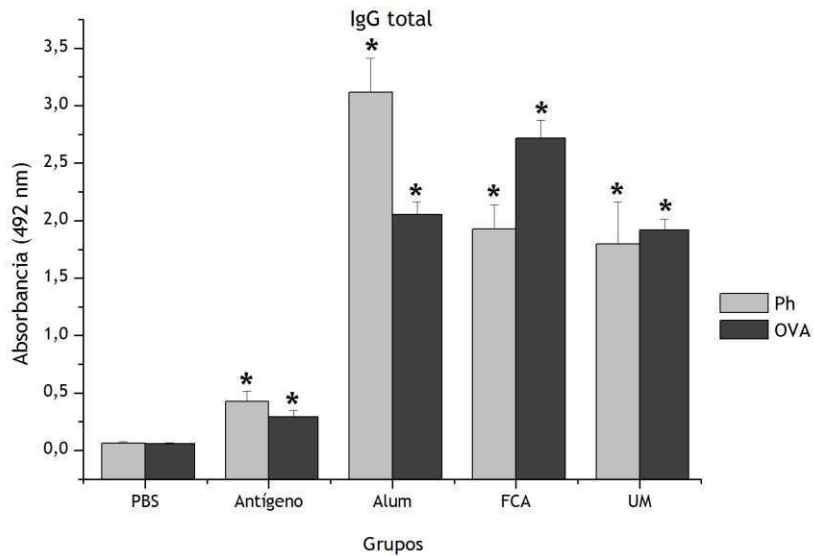


Fig. 2. Nivel de inmunoglobulinas específicas IgG totales en suero obtenidas al vacunar ratones con distintos adyuvantes. Ph: Antígeno particulado de *P. dicentrarchi*; OVA: ovoalbúmina; Alum: hidróxido de aluminio; FCA: adyuvante completo de Freund; UM: ulvano metacrilatado. Los datos se muestran media \pm desviación estándar. Todos los grupos con adyuvante mostraron diferencias significativas con su grupo respectivo sin adyuvante ($p < 0,05$). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas con el grupo PBS ($p < 0,05$).

El nivel de IgG_{2a} e IgG₁ específicas en suero se ha utilizado en varios trabajos para determinar el perfil de Th1/Th2 polarizado en la vacunación (Brewer *et al.*, 1996; Habjanec *et al.*, 2008; Klimka *et al.*, 2015; Hjertner *et al.*, 2018). Hemos determinado los niveles de IgG_{2a} e IgG₁ en ratones inmunizados con varios adyuvantes y dos antígenos. Los grupos antígeno no adyuvantados indujeron un nivel de IgG_{2a}

similar al grupo PBS (Fig. 3) y un nivel significativamente mayor en el caso de la IgG₁ (Fig. 4). Cuando se usó OVA como antígeno, los niveles de IgG_{2a} fueron bajos en los grupos en los que se administró con alum o UM, incrementándose en los grupos inyectados con OVA y FCA (Fig. 3). Sin embargo, los niveles de IgG₁ fueron elevados en todos los grupos (Fig. 4). Al utilizar el antígeno particulado de *P. dicentrarchi*, se observó que las tres combinaciones de adyuvante y antígeno indujeron la producción de niveles altos de IgG_{2a}, siendo especialmente elevada en la combinación antígeno+FCA (Fig. 3). En el caso de IgG₁, la mayor respuesta se observó con la combinación antígeno+alum (Fig. 4).

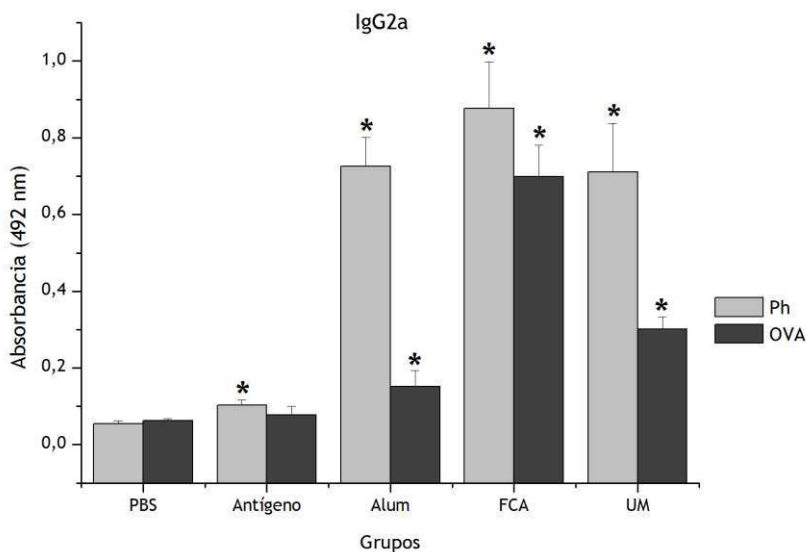


Fig. 3. Nivel de inmunoglobulinas específicas de isotipo IgG_{2a} obtenidas al vacunar ratones con distintos adyuvantes. Ph: Antígeno particulado de *P. dicentrarchi*; OVA: ovoalbúmina; Alum: hidróxido de aluminio; FCA: adyuvante

completo de Freund; UM: ulvano metacrilatado. Los datos se muestran media \pm desviación estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas con el grupo PBS ($p < 0,05$).

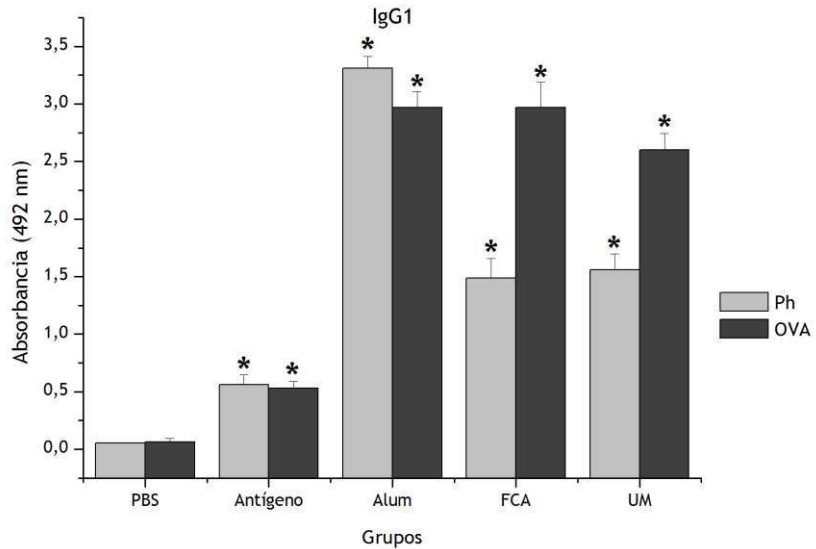


Fig. 4. Nivel de inmunoglobulinas específicas de isotipo IgG₁ obtenidas al vacunar ratones con distintos adyuvantes. Ph: Antígeno particulado de *P. dicentrarchi*; OVA: ovoalbúmina; Alum: hidróxido de aluminio; FCA: adyuvante completo de Freund; UM: ulvano metacrilatado. Los datos se muestran media \pm desviación estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas con el grupo PBS ($p < 0,05$).

Al analizar la relación IgG_{2a}/IgG₁, observamos que la mayor ratio se produjo al utilizar el adyuvante FCA, seguido del UM y del alum, independiente del antígeno utilizado (Fig. 5). Si comparamos los antígenos, la ratio fue mayor con el antígeno de *P dicentrarchi* que con la OVA.

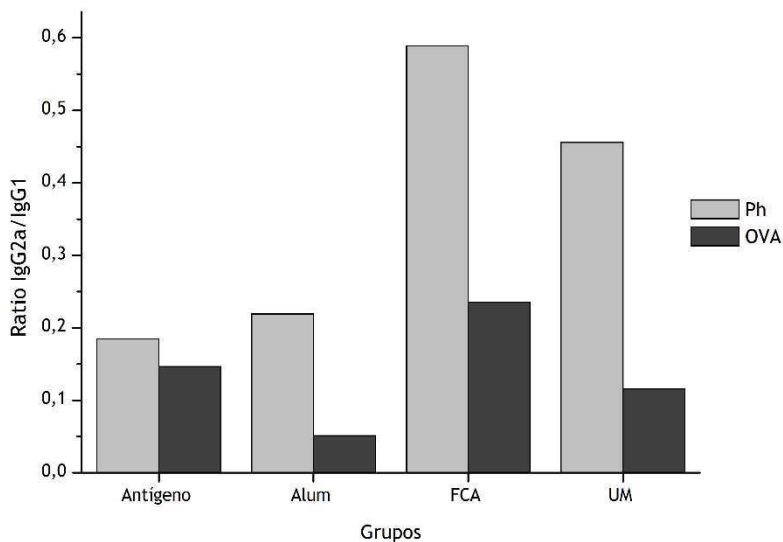


Fig. 5. Ratio de IgG_{2a}/IgG_1 . Los datos se obtienen de dividir densidad óptica (OD) de IgG_{2a} entre la de IgG_1 para cada una de las muestras. Ph: Antígeno particulado de *P. dicentrarchi*; OVA: ovoalbúmina; Alum: hidróxido de aluminio; FCA: adyuvante completo de Freund; UM: ulvano metacrilatado.

3.4. Expresión de factores de transcripción y citocinas en células peritoneales de ratón

La ratio *Tbx21/Gata3* puede emplearse como un marcador temprano de polarización Th1/Th2 en poblaciones mezcladas de esplenocitos de rata y ratón (Chakir *et al.*, 2003). Aquí se ha usado para determinar la respuesta temprana de las células peritoneales de ratón frente a los antígenos OVA y antígeno particulado de *P. dicentrarchi*, con o sin adyuvantes (Fig. 6). En general, los grupos

inyectados presentan una ratio *Tbx/Gata3* mayor que el control al día uno tras la inyección y desciende, se mantiene o aumenta, dependiendo del adyuvante empleado. El grupo no inyectado (C-) presenta una ratio de expresión cercana a la unidad. Los grupos inyectados presentan una ratio *Tbx/Gata3* elevada a los 3 días de la inyección con respecto a su grupo antígeno, OVA o Ph, excepto en el caso del Ph-UM, que muestra una ratio baja. El CM incrementó la ratio *Tbx/Gata3* a un día con los dos antígenos empleados, descendiendo a los 3 días (Fig. 6).

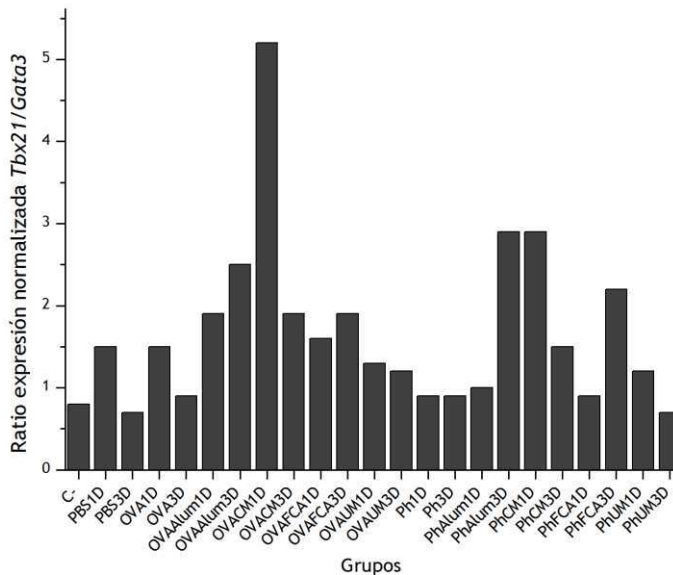


Fig. 6. Ratio *Tbx21/Gata3* de la expresión normalizada de células peritoneales de ratones a 1 y 3 días de la inyección. Los datos se obtienen de dividir el valor de la expresión normalizada del gen *Tbx21* entre la de *Gata3* para cada una de las muestras.

Como se puede observar en la Fig 7., los antígenos no tuvieron efectos relevantes sobre la expresión de los genes *Gata3*, *Tbx21*, *Il4* e *Ifng*. Al día 1, el alum con OVA provocó una fuerte infraexpresión de los genes *Gata3*, *Tbx21* e *Il4*, pero no tuvo efecto sobre el *Ifng*. Curiosamente, al día 3 se produjo el efecto contrario induciendo sobreexpresión de los 4 genes analizados. En el resto de los grupos, la combinación adyuvante+antígeno no modificó la expresión de los genes analizados al día 1, pero indujeron un incremento en la expresión al día 3 (Fig. 7).

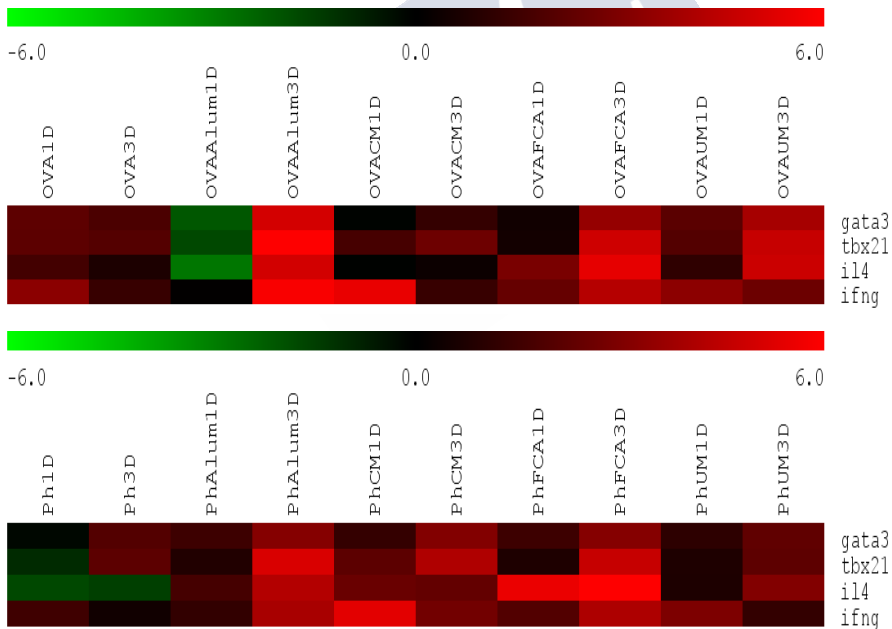


Fig. 7. Mapas de calor de expresión de células peritoneales libres de ratón inyectados con distintos tratamientos. Los datos están normalizados con respecto al control PBS y expresados como \log_2 . Los colores rojos indican sobreexpresión y los verdes infraexpresión con respecto al PBS. *Tbx21*: factor de

transcripción caja T 21; *Gata3*: : proteína 3 de unión a la secuencia de ADN GATA; *Ifng*: interferón γ ; *Il4*: interleucina 4.

3.5. Vacunación con carboximetilcelulosa metacrilatada y ulvano metacrilatado en rodaballo

Cuando la vacunación se llevó a cabo en agua de mar a finales de invierno/principios de primavera (agua de mar sobre 14 °C), ninguno de los grupos indujo un buen nivel de anticuerpos a los 30 días de la segunda inmunización, siendo el grupo VacCM el único que dio un valor significativamente mayor al grupo PBS (Fig. 8). En este experimento, no se realizó la infección experimental al ser tan reducida la respuesta.

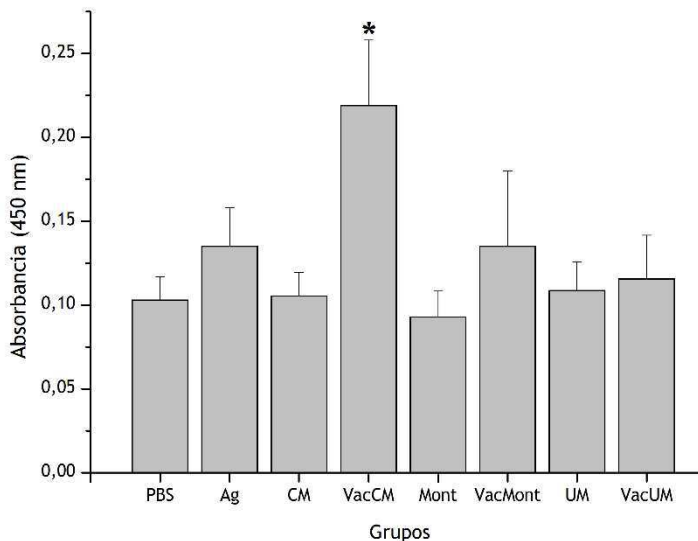


Fig. 8. Niveles de IgM específica anti-*P. dicentrarchi* en suero de rodaballo a 30 días de la segunda inmunización. Ag: Antígeno particulado de *P. dicentrarchi*; CM: carboximetilcelulosa metacrilatada; VacCM: Carboximetilcelulosa metacrilatada y antígeno; Mont: Adyuvante Montanide ISA 763A; VacMont: Adyuvante Montanide ISA 763A y antígeno; UM: ulvano metacrilatado; VacUM: ulvano metacrilatado y antígeno. Los datos se muestran como media \pm desviación estándar (n=10). El asterisco indica deiferencias estadísticas entre PBS y el resto de los grupos, siendo $p < 0,05$

3.6. Análisis del hidrogel de ulvano-quitosano b: efecto sobre el nivel de IgM en suero y sobre la protección frente a *P. dicentrarchi* en rodaballo

Uno de las mezclas generadas, formadas por hidrogel de ulvano-quitosano b, se probó en un experimento de vacunación/infección, analizando sus efectos sobre la producción de IgM y sobre la protección generada en rodaballo frente a *P. dicentrarchi*. En el experimento, el hidrogel se mezcló con antígeno particulado, y utilizamos Montanide con antígeno entero como control positivo. El hidrogel de ulvano-quitosano b indujo un nivel de IgM específica en suero significativamente superior a los grupos PBS y antígeno-Montanide a los 30 días de la segunda inyección (Fig. 9).

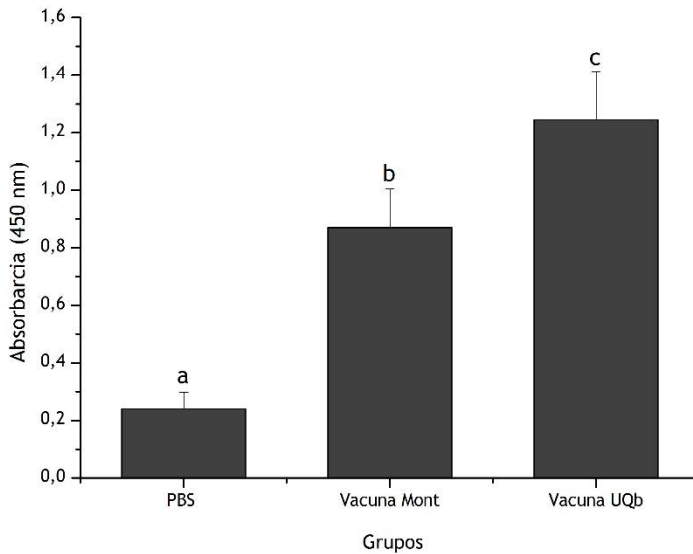


Fig. 9. Niveles de IgM específica anti-*P. dicentrarchi* en suero de rodaballo a 30 días de la segunda inmunización. Los peces se inyectaron con PBS, Montanide ISA 763A y antígeno entero (Vacuna Mont) o hidrogel de quitosano ulvano (b) con antígeno particulado (Vacuna UQb). Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar ($n=10$). Diferentes letras indica diferencias significativas entre grupos, siendo $p<0,05$.

Los peces inyectados con la vacuna basada en ulvano-quitosano b apenas mostraron daños, excepto por algunas adherencias dispersas entre los órganos (Fig. 10).

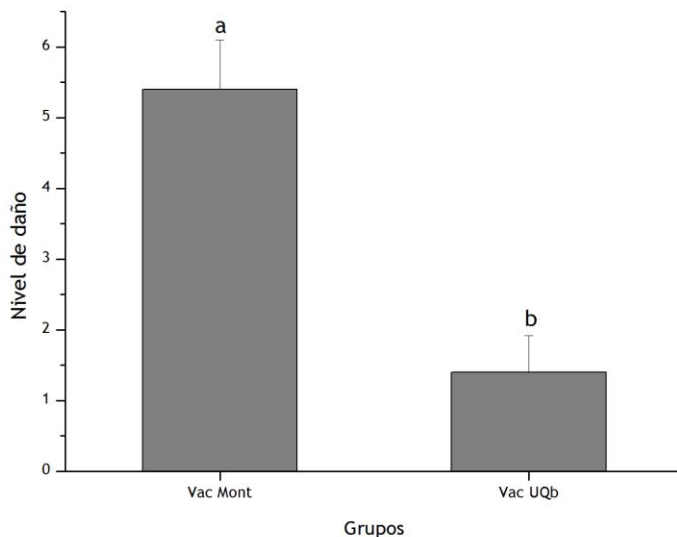


Fig. 10. Daños ocasionados en la cavidad peritoneal de rodaballos vacunados. Montanide ISA 763A y antígeno entero (Vacuna Mont) o hidrogel de quitosano-
ulvano b con antígeno particulado (Vacuna UQb) Los daños se valoraron entre 0 y 6. 0: Normal; 1: Alguna adherencia dispersa entre órganos internos; 2: Algunas adherencias que unen órganos internos con la pared de la cavidad peritoneal; 3: Adherencias moderadas con la presencia de pequeños granulomas visibles; 4: Adherencias moderadas con grandes granulomas visibles; 5: Adherencias extensas que afectan a órganos internos (con fusión entre ellos) y adherencias de los órganos a la pared de la cavidad; 6: Los órganos internos forman un bloque con la pared de la cavidad. Se analizaron n=10 peces por grupo. Diferentes letras indica diferencias significativas entre grupos, siendo $p < 0,01$.

Se llevó a cabo una infección experimental a los 30 días de la segunda inyección para comparar la protección de los tratamientos. Como control negativo se empleó un grupo PBS y como control

positivo se empleó la vacuna previamente descrita (Sanmartín *et al.*, 2008; Lamas *et al.*, 2008). La mortalidad acumulada en el día 16 fue del 86% en el grupo inyectado con PBS, mientras que en los grupos vacunados con Montanide con antígeno entero o hidrogel de ulvano- quitosano b con antígeno particulado fue de 43% y 22%, respectivamente (Fig. 11). Los RPS fueron del 50 % para la vacuna Montanide y del 75 % para la vacuna ulvano- quitosano b.

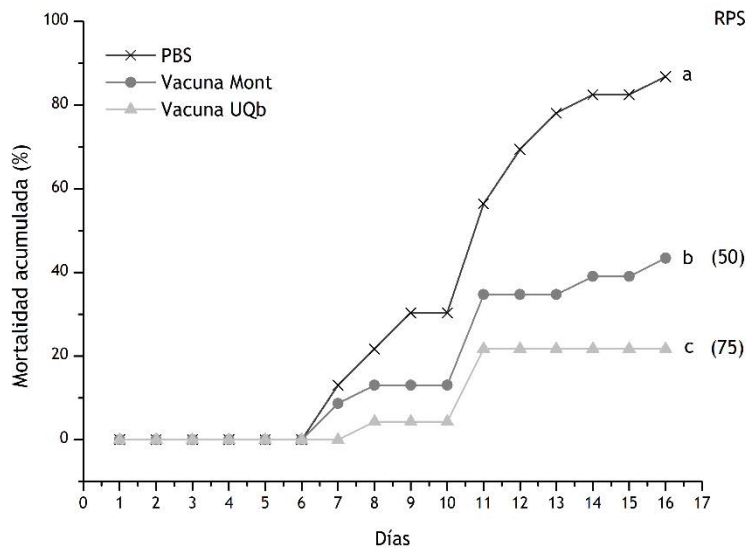


Fig. 11. Porcentaje de mortalidad acumulada de rodaballos infectados con *P. dicentrarchi* durante los 16 días siguientes a la infección. Los peces se inyectaron con PBS, Montanide ISA 763A y antígeno entero (Vacuna Mont) o hidrogel de ulvano- quitosano b-antígeno particulado (Vacuna UQb). Los valores que se indican corresponden al porcentaje de mortalidad acumulada observada durante 16 días. Las letras (a-c) indican diferencias significativas entre grupos

siendo $p < 0,01$. El porcentaje relativo de supervivencia (RPS) se indica entre paréntesis.

4. Discusión

Las vacunas son posiblemente la mejor forma de proteger a los organismos frente a enfermedades infecciosas (Tafalla *et al.*, 2013). El empleo de vacunas de última generación, tales como las basadas en proteínas recombinantes o plásmidos de ADN, son frecuentemente poco inmunogénicas, por lo que se hace necesario administrarlas conjuntamente con un adyuvante que module su respuesta. El conocimiento de los mecanismos mediante los cuales los adyuvantes activan o modulan el sistema inmunitario es muy relevante para poder formular vacunas que puedan estimular una respuesta inmunitaria adquirida para el tipo de patógeno que se pretenda combatir. Cuando las células Th vírgenes reconocen a un antígeno presentado por células dendríticas en el contexto de las MHCII, estas proliferan y se diferencian hacia varios tipos, incluidas las células Th1, Th2 y Th17, mostrando cada una de ellas un patrón de citocinas y factores de transcripción (Wang y Secombes, 2013). Que las células Th vírgenes se diferencien en un tipo celular u otro depende de la naturaleza del patógeno reconocido y presentado por las células dendríticas (Zhu y Paul, 2008). En las vacunaciones, los antígenos empleados pueden ser poco inmunogénicos y se hace necesaria la formulación con un adyuvante que module la respuesta frente al antígeno (Tafalla *et al.*, 2013). Además, estos adyuvantes deben ser capaces de estimular a las

poblaciones adecuadas de células Th para combatir al patógeno de forma adecuada.

En base a nuestra experiencia con el ulvano como agente inmunoestimulante (Castro *et al.*, 2004, 2006) y, en base a estudios realizados en mamíferos, hemos desarrollado varias formulaciones y hemos seleccionado tres de ellas como potenciales adyuvantes en vacunas para peces: ulvano metacrilatado, carboximetilcelulosa metacrilatada e hidrogel de ulvano y quitosano. Dentro de este último, nos hemos quedado con la formulación "b". Los adyuvantes se testaron *in vitro* (análisis del estallido respiratorio en leucocitos de rodaballo) e *in vivo* en peces y en ratón, analizando sus efectos sobre la expresión de varios genes relacionados con las respuestas Th1 y Th2, producción de anticuerpos específicos y protección frente a *P. dicentrarchi*.

Los resultados obtenidos indican que los fagocitos de riñón anterior de rodaballo responden directamente a los adyuvantes carboximetilcelulosa metacrilatada, ulvano metacrilatado y ulvano-quitosano b aumentando la producción de O_2^- y sus derivados. Las especies reactivas de oxígeno son tóxicas para los microorganismos y son generadas por los fagocitos en respuesta a numerosos estímulos (Secombes, 1996), incluidos los inmunoestimulantes como el ulvano (Castro *et al.*, 2006), quitosano (Gopalakannan *et al.*, 2006) o glucano (Secombes, 1996). Las modificaciones químicas durante la elaboración del hidrogel de ulvano-quitosano y del ulvano

metacrilatado no ha supuesto la pérdida de la capacidad inmunoestimulante que poseen el quitosano y el ulvano. La carboximetilcelulosa metacrilatada ha mostrado una baja respuesta, no resultando inmunoestimulante a concentraciones menores de 1 mg/ml. Sin embargo, no hemos podido determinar si esta se debe a la reacción con el anhídrido metacrilato o a que la carboximetilcelulosa tiene una baja capacidad inmunoestimulante. Aunque algunos autores han documentado un efecto inhibitorio de la actividad del estallido respiratorio a concentraciones elevadas del inmunoestimulante (Castro *et al.*, 1999; Figueras *et al.*, 1997), nosotros no hemos observado este efecto con ninguno de los adyuvantes a las concentraciones empleadas.

Aunque existen vacunas para peces frente a parásitos, bacterias y virus (Sanmartín *et al.*, 2008; Lamas *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2005; León-Rodríguez *et al.*, 2012; Pereiro *et al.*, 2012), las bases inmunológicas por las que estas confieren protección aún no han sido dilucidadas. La forma directa de determinar el perfil Th1/Th2 en peces es mediante la medida de los niveles de $\text{Ifn}\gamma$ (Th1) e Il4/13 (Th2) en suero. Debido a la falta de anticuerpos específicos frente $\text{Ifn}\gamma$ o Il4/13 en rodaballo, hemos empleado ratones como modelo en el que determinar la polarización Th1/Th2. Los ratones poseen diversos isotipos de inmunoglobulinas G, entre los que se encuentran la IgG_{2a} y la IgG_1 . El $\text{IFN}\gamma$ y la IL4 inducen un cambio de isotipo a las subclases IgG_{2a} o IgG_1 , respectivamente. De este modo la dominancia de IgG_{2a} o

IgG₁ en suero indica una polarización Th1 o Th2, respectivamente (Finkelman *et al.*, 1990). El perfil de estos dos isotipos puede emplearse para determinar el tipo de respuesta Th1/Th2 inducida (Brewer *et al.*, 1996; Habjanec *et al.*, 2008; Klimka *et al.*, 2015; Hjertner *et al.*, 2018). La OVA es un antígeno ampliamente empleado como estándar para definir las respuestas Th1/Th2 polarizadas por los adyuvantes (Brewer *et al.*, 1996; Wen *et al.*, 2011; Yanase *et al.*, 2014; Toda y Yoshino, 2016). En varios trabajos se ha documentado que el hidróxido de aluminio conjuntamente con la ovoalbúmina induce niveles muy bajos, o mismo indetectables, de anticuerpos IgG₁ específicos para ovoalbúmina (Brewer *et al.*, 1996; Yanase *et al.*, 2014; Toda y Yoshino, 2016). Además, el adyuvante completo de Freund con ovalbúmina induce una respuesta Th1/Th2 mixta, caracterizada por niveles elevados de IgG_{2a} e IgG₁ (Brewer *et al.*, 1996). En concordancia con estos resultados, nosotros también hemos obtenido unos niveles muy bajos de IgG_{2a} específica en los ratones vacunados con hidróxido de aluminio y ovoalbúmina y niveles elevados de IgG_{2a} e IgG₁ específica en los ratones vacunados con Adyuvante completo de Freund y ovalbúmina. También hemos determinado que la inyección del adyuvante ulvano metacrilatado conjuntamente con OVA produce anticuerpos específicos IgG₁ e IgG_{2a}, lo cual sugiere una respuesta mixta Th1/Th2. De forma similar, todos los adyuvantes empleados mostraron unos elevados niveles de IgG_{2a} e IG₁, sugiriendo que todos inducen una respuesta Th1/Th2

mixta cuando se inyectan conjuntamente con antígeno particulado de *P. dicentrarchi*. El ulvano metacrilato indujo una respuesta mixta, similar a la del FCA. Curiosamente, el hidróxido de aluminio también indujo niveles altos de IgG_{2a} e IG₁, aunque el FCA mostró una ratio más elevada de IgG_{2a}/IgG₁, presentando un carácter Th1 más marcado. Aunque el hidróxido de aluminio se ha considerado tradicionalmente un inductor de respuestas Th2 (Grun y Maurer, 1989; Brewer *et al.*, 1996; Hjertner *et al.*, 2018), no es infrecuente que induzca niveles altos de IgG_{2a} con ciertos antígenos. Por ejemplo Andreasen *et al.* (2015) observaron que el hidróxido de aluminio inyectado conjuntamente con el virus de la polio inactivado induce una respuesta Th1 parcial. La inducción de respuestas mixtas Th1/Th2 es común con varios adyuvantes, tales como las nanopartículas de silicio nSP30 (Toda y Yoshino, 2016), el adyuvante basado en saponinas G3 (Hjertner *et al.*, 2018), o nanopartículas de quitosano (Wen *et al.*, 2011). En el caso del quitosano existe discrepancia, ya que algunos autores sostienen que induce una respuesta Th1 (Carroll *et al.*, 2016). No obstante, se ha sugerido que el tipo de quitosano empleado es relevante y puede modificar el perfil Th1/Th2 (Riteau y Sher, 2016). Aunque no hay muchos trabajos en los que se analice el perfil Th1/Th2 inducido por adyuvantes en peces, la respuesta Th1/Th2 polarizada por el adyuvante oleoso Montanide ha sido la más estudiada, probablemente por ser el adyuvante más comúnmente empleado en estos organismos. En salmónidos, el adyuvante

Montanide ISA 763 A VG no polariza claramente una respuesta Th1 o Th2 durante vacunaciones frente a bacterias (Kumari *et al.*, 2013; Chettri *et al.*, 2015; Jaafar *et al.*, 2015) o a virus (Kumari *et al.*, 2013), sino que se caracteriza por una respuesta mixta.

Las células peritoneales residentes son las primeras en entrar en contacto con los componentes de una vacuna cuando se administra intraperitonealmente. Además, se ha sugerido que las células peritoneales de ratón pueden tener una importante función en la respuesta inmunitaria frente a microorganismos (Gautam *et al.*, 2019). En un estudio previo, hemos analizado la respuesta *in vivo* de las células peritoneales de rodaballo a distintos adyuvantes mediante un *microarray*, encontrando una regulación positiva de genes relacionados con el citoesqueleto de actina y la apoptosis a tiempos cortos (Fontenla *et al.*, 2016). En el *microarray* no contábamos con genes relacionados con las respuestas de células Th y no pudimos observar la regulación de los mismos. A pesar de que el genoma de rodaballo ha sido recientemente secuenciado (Figueras *et al.*, 2016), aún existen genes relacionados con las respuestas Th1 y Th2 que no han sido identificados, tales como los genes *il4/13*. Debido a esto, decidimos analizar *in vivo* la respuesta en células peritoneales de ratón frente a los nuevos adyuvantes desarrollados en este trabajo. Se ha sugerido que las células peritoneales de ratón tienen una importante función en la respuesta inmunitaria frente a microorganismos (Gautam *et al.*, 2019). Los factores de transcripción TBX21 y GATA3 son

indispensables para determinar la diferenciación de las células Th a Th1 y Th2, respectivamente (Zhu *et al.*, 2010). Aquí hemos tratado de definir el tipo de ambiente Th1/Th2 que se da en la cavidad peritoneal de ratones a tiempos cortos tras la vacunación. La ratio de la expresión *Tbx21/Gata3* puede emplearse como un marcador temprano de polarización Th1/Th2 en poblaciones de esplenocitos de rata y ratón (Chakir *et al.*, 2003). La ratio *Tbx21/Gata3* siempre es igual o mayor en todos los grupos que la observada en los ratones no inyectados o en los inyectados con PBS. Esto podría indicar que, al menos a tiempos cortos, en la cavidad peritoneal existe un dominio del ambiente Th1. Aunque la expresión de los factores de transcripción es muy variable, parece claro que los adyuvantes estimulan específicamente las respuestas Th1 y Th2 en la cavidad peritoneal, al encontrar muchos grupos en los que se sobreexpresan *Tbx21* o/y *Gata3*.

En trabajos previos, nuestro grupo ha desarrollado vacunas frente a *P. dicentrarchi* basadas en compuestos oleosos (Sanmartín *et al.*, 2008, Lamas *et al.*, 2008) y en microsferas de polímeros biodegradables (León-Rodríguez *et al.*, 2012). Sin embargo, las vacunas basadas en compuestos oleosos frecuentemente provocan efectos adversos (Tafalla *et al.*, 2013; Noia *et al.*, 2014; Jaafar *et al.*, 2015) y las microsferas tienen elevados costes de producción. En este trabajo, hemos elaborado adyuvantes basados en polímeros de origen natural para reducir los efectos adversos de las vacunas actuales de peces desde un punto de vista económico y hemos determinado la

protección que han producido en peces. Los adyuvantes carboximetilcelulosa metacrilatada y ulvano metacrilatado no indujeron un buen nivel de anticuerpos en la vacunación experimental en peces, a pesar de que el grupo de carboximetilcelulosa metacrilatada mostro unos títulos de anticuerpos superiores al grupo control. Curiosamente, la vacuna Montanide ISA 763 y antígeno entero, elaborada de igual forma a lo descrito en trabajos previos de nuestro grupo (Sanmartín *et al.*, 2008, Lamas *et al.*, 2008) y empleada en el experimento como control positivo no indujo un nivel de anticuerpos significativamente distinto al PBS. Este experimento se llevó a cabo a finales de invierno/principios de primavera, con temperatura del agua baja; siendo seguramente este el motivo por el que no se produjo una buena respuesta. Siendo los teleósteos organismos ectodermos, su temperatura corporal y sus procesos biológicos están influidos por la temperatura ambiente (Makrinos y Bowden, 2016). En ensayos recientes de vacunación se ha estudiado la influencia de la temperatura en la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, la vacunación de lumpo (*Cyclopterus lumpus*) con una vacuna oleosa frente a *Aeromonas salmonicida* a bajas temperaturas induce un nivel de IgM específica menor que a altas (Erkinharju *et al.*, 2018). No solo el nivel de IgM específica se ve afectada por la temperatura del agua, sino que el nivel total también depende de la temperatura, encontrándose niveles mayores a temperaturas más altas en varias especies de teleósteos (Magnadóttir *et al.*, 1999; Domínguez *et al.*,

2004). A pesar de estos resultados negativos en rodaballo, el adyuvante ulvano metacrilatado indujo un buen nivel de anticuerpos específicos cuando se inyectó en ratón, por lo que son necesarios experimentos adicionales en rodaballo a una temperatura controlada para determinar si este adyuvante es susceptible de ser empleado en vacunas de peces.

Finalmente, hemos desarrollado una vacuna intraperitoneal de formulación sencilla y económica frente a *P. dicentrarchi* basada en los polímeros biodegradables quitosano y ulvano, presentes en artrópodos y algas, respectivamente, cuya capacidad inmunoestimulante ya ha sido puesta de manifiesto (Castro *et al.*, 2006; León-Rodríguez *et al.*, 2012; León-Rodríguez *et al.*, 2013). Esta vacuna ha demostrado, no solo aumentar el nivel de IgM específica y la supervivencia de los peces en relación a la vacuna de Montanide, sino también causar muy pocos daños en el sitio de inyección. La vacuna presentó un RPS del 75%, superando al RPS de 68% obtenido para una vacuna diseñada frente a *P. dicentrarchi* basada en microesferas de quitosano o al de 58% otra basada en FCA (León-Rodríguez *et al.*, 2012). El RPS de la vacuna de ulvano-quitosano b es inferior al RPS del 77 % de una vacuna frente a *P. dicentrarchi* basada en el adyuvante oleoso Montanide ISA 763 A (Sanmartín *et al.*, 2008) o al 100% de supervivencia obtenido con una versión optimizada de la misma vacuna por Lamas *et al.*, 2008. Lamentablemente, el desarrollo del adyuvante ulvano-quitosano b empleado en esta vacuna fue

posterior a los otros y el perfil Th1/Th2 no ha podido ser determinado aún. En el futuro deben ser llevados a cabo más experimentos tales como determinar la existencia de daños a nivel microscópico, el perfil Th1/Th2 polarizado en ratones y el desarrollo de herramientas que permitan analizar la polarización llevada a cabo durante la vacunación en rodaballo.

5. Bibliografía

- Andreasen, L.V., Hansen, L.B., Andersen, P., Agger, E.M., Dietrich, J. (2015). Aluminium hydroxide potentiates a protective Th1 biased immune response against polio virus that allows for dose sparing in mice and rats. *Vaccine*, 33: 1873-1879. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.02.011
- Barbucci, R., Leone, G., Vecchiullo, A. (2004). Novel carboxymethylcellulose-based microporous hydrogels suitable for drug delivery. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 15: 607-619. doi: 10.1163/156856204323046870
- Barua, S., Das, B. (2016). Preparation and characterization of chitosan based hydrogel. *J. Pharm. Pharma. Sci.*, 5(6): 2202-2208. doi: 10.20959/wjpps20166-7006
- Behera, T., Nanda, P.K., Mohanty, C., Mohapatra, D., Swain, P., Das, B.K., Routray, P., Mishra, B.K., Sahoo, S.K. (2010). Parenteral immunization of fish, *Labeo rohita* with Poly D, L-lactide-co-glycolic acid (PLGA) encapsulated antigen microparticles

- promotes innate and adaptive immune responses. *Fish Shellfish Immunol.*, 28(2): 320-325. doi: 10.1016/j.fsi.2009.11.009
- Brewer, J.M., Conacher, M., Satoskar, A., Bluethmann, H., Alexander, J. (1996). In interleukin-4-deficient mice, alum not only generates T helper 1 responses equivalent to Freund's complete adjuvant, but continues to induce T helper 2 cytokine production. *Eur. J. Immunol.*, 26: 2062-2066. doi: 10.1002/eji.1830260915
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.*, 55(4): 611-622. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797
- Bustin, S.A., Wittwer, C.T. (2017). MIQE: A Step Toward More Robust and Reproducible Quantitative PCR. *Clin. Chem.*, 63(9): 1537-1538. doi: 10.1373/clinchem.2016.268953
- Carroll, E.C., Jin, L., Mori, A., Muñoz-Wolf, N., Oleszycka, E., Moran, H.B.T., Mansouri, S., McEntee, C.P., Lambe, E., Agger, E.M., Andersen, P., Cunningham, C., Hertzog, P., Fitzgerald, K.A., Bowie, A.G., Lavelle, E.C. (2016). The vaccine adjuvant chitosan promotes cellular immunity via DNA sensor cGAS-STING-dependent induction of type I interferons. *Immunity*, 44: 597-608. doi: 10.1016/j.immuni.2016.02.004

- Castro, R., Couso, N., Obach, A., Lamas, J. (1999). Effect of different β -glucans on the respiratory burst of turbot (*Psetta maxima*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) phagocytes. *Fish Shellfish Immunol.*, 9: 529-541. doi: 10.1006/fsim.1999.0210
- Castro, R., Zarra, I., Lamas, J. (2004). Water-soluble seaweed extracts modulate the respiratory burst activity of turbot phagocytes. *Aquaculture*, 229: 67-78. doi: 10.1016/S0044-8486(03)00401-0
- Castro, R., Piazzon, M.C., Zarra, I., Leiro, J., Noya, M., Lamas, J. (2006). Stimulation of turbot phagocytes by *Ulva rigida* C. Agardh polysaccharides. *Aquaculture*, 254(1-4): 9-20. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.10.012
- Chakir, H., Wang, H., Lefebvre, D.E., Webb, J., Scott, F.W. (2003). T-bet/GATA-3 ratio as a measure of the Th1/Th2 cytokine profile in mixed cell populations: Predominant role of GATA-3. *J. Immunol. Methods*, 278: 157-169. doi: 10.1016/S0022-1759(03)00200-X
- Chettri, J.K., Skov, J., Jaafar, R.M., Krossøy, B., Kania, P.W., Dalsgaard, I., Buchmann, K. (2015). Comparative evaluation of infection methods and environmental factors on challenge success: *Aeromonas salmonicida* infection in vaccinated rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol.*, 44: 485-495. doi: 10.1016/j.fsi.2015.03.003
- Costa, C., Alves, A., Pinto, P.R., Sousa, R.A., Borges Da Silva, E.A., Reis, R.L., Rodrigues, A.E. (2012). Characterization of ulvan

- extracts to assess the effect of different steps in the extraction procedure. *Carbohydr. Polym.*, 88: 537-546. doi: 10.1016/j.carbpol.2011.12.041
- Cui, L., Xu, W., Ai, Q., Wang, D., Mai, K. (2013). Effects of dietary chitosan oligosaccharide complex with rare earth on growth performance and innate immune response of turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Aquac. Res.*, 44: 683-690. doi: 10.1111/j.1365-2109.2011.03072.x
- Dominguez, M., Takemura, A., Tsuchiya, M., Nakamura, S. (2004). Impact of different environmental factors on the circulating immunoglobulin levels in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 241: 491-500. doi: 10.1016/j.aquaculture.2004.06.027
- Erkinharju, T., Dalmo, R.A., Vågsnes, Hordvik, I., Seternes, T. (2018). Vaccination of Atlantic lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) at a low temperature leads to a low antibody response against *Aeromonas salmonicida*. *J. Fish Dis.*, 41: 613-623. doi: 10.1111/jfd.12760
- Estévez, J., Leiro, J., Santamarina, M.T., Domínguez, J., Ubeira, F.M. (1994). Monoclonal antibodies to turbot (*Scophthalmus maximus*) immunoglobulins: characterization and applicability in immunoassays. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 41(3-4): 353-366. doi: 10.1016/0165-2427(94)90107-4

- Figueras, A., Santarém, M., Novoa, B. (1997). *In vitro* immunostimulation of turbot (*Scophthalmus maximus*) leucocytes with β -glucan and/or *Photobacterium damsela* bacterin. *Fish Pathol.*, 32(3): 153-157.
- Figueras, A., Robledo, D., Corvelo, A., Hermida, M., Pereiro, P., Rubiolo, J.A., Gómez-Garrido, J., Carreté, L., Bello, X., Gut, M., Gut, I.G., Marcet-Houben, M., Forn-Cuní, G., Galán, B., García, J.L., Abal-Fabeiro, J.L., Pardo, B.G., Taboada, X., Fernández, C., Vlasova, A., Hermoso-Pulido, A., Guigó, R., Álvarez-Dios, J.A., Gómez-Tato, A., Viñas, A., Maside, X., Gabaldón, T., Novoa, B., Bouza, C., Alioto, T., Martínez, P. (2016). Whole genome sequencing of turbot (*Scophthalmus maximus*; Pleuronectiformes): A fish adapted to demersal life. *DNA Res.*, 23: 181-192. doi: 10.1093/dnares/dsw007
- Finkelman, F.D., Holmes, J., Katona, I.M., Urban, J.F., Beckmann, M.P., Park, L.S., Schooley, K.A., Coffman, R.L., Mosmann, T.R., Paul, W.E. (1990). Lymphokine control of *in vivo* immunoglobulin isotype selection. *Annu. Rev. Immunol.*, 8: 303-333. doi: 10.1146/annurev.iy.08.040190.001511
- Fontenla, F., Blanco-Abad, V., Pardo, B.G., Folgueira, I., Noia, M., Gómez-Tato, A., Martínez, P., Leiro, J.M., Lamas, J. (2016). Vaccine-induced modulation of gene expression in turbot peritoneal cells. A microarray approach. *Mol. Immunol.*, 75: 188-99. doi: 10.1016/j.molimm.2016.06.001

- Galindo-Villegas, J., García-Alcazar, A., Meseguer, J., Mulero, V. (2019). Aluminum adjuvant potentiates gilthead seabream immune responses but induces toxicity in splenic melanomacrophage centers. *Fish Shellfish Immunol.*, 85: 31-43. doi: 10.1016/j.fsi.2018.02.047
- Gautam, A., Park, B.K., Kim, T.H., Akauliya, M., Kim, D., Maharjan, S., Park, J., Kim, J., Lee, H., Park, M.S., Lee, Y., Kwon, H.J. (2019). Peritoneal cells mediate immune responses and cross-protection against influenza A virus. *Front. Immunol.*, 10: 1160. doi: 10.3389/fimmu.2019.01160
- Gopalakannan, A., Arul, V. (2006). Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. *Aquaculture*, 255: 179-187. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.01.012
- Grun, J.L., Maurer, P.H. (1989). Different T helper cell subsets elicited in mice utilizing two different adjuvant vehicles: The role of endogenous interleukin 1 in proliferative responses. *Cell. Immunol.*, 121: 134-145. doi: 10.1016/0008-8749(89)90011-7
- Guriec, N., Bussy, F., Gouin, C., Mathiaud, O., Quero, B., Le Goff, M., Collén, P.N. (2018). Ulvan activates chicken heterophils and monocytes through toll-like receptor 2 and toll-like receptor 4. *Front. Immunol.*, 9: 2725. doi: 10.3389/fimmu.2018.02725

- Habjanec, L., Halassy, B., Tomasić, J. (2008). Immunomodulatory activity of novel adjuvant formulations based on Montanide ISA oil-based adjuvants and peptidoglycan monomer. *Int Immunopharmacol.*, 8(5): 717-724. doi: 10.1016/j.intimp.2008.01.017
- Hamajima, K., Sasaki, S., Fukushima, J., Kaneko, T., Xin, K.Q., Kudoh, I., Okuda, K. (1998). Intranasal administration of HIV-DNA vaccine formulated with a polymer, carboxymethylcellulose, augments mucosal antibody production and cell-mediated immune response. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 88: 205-10. doi: 10.1006/clin.1998.4566
- Haug, A. (1976). The influence of borate and calcium on the gel formation of a sulfated polysaccharide from *Ulva lactuca*. *Acta Chem. Scand. B.*, 30(6): 562-566.
- Hjertner, B., Bengtsson, T., Morein, B., Paulie, S., Fossum, C. (2018). A novel adjuvant G3 induces both Th1 and Th2 related immune responses in mice after immunization with a trivalent inactivated split-virion influenza vaccine. *Vaccine*, 36: 3340-3344. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.04.054
- Hoare, R., Jung, S.J., Ngo, T.P.H., Bartie, K., Bailey, J., Thompson, K.D., Adams, A. (2019). Efficacy and safety of a non-mineral oil adjuvanted injectable vaccine for the protection of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against *Flavobacterium psychrophilum*.

- Fish Shellfish Immunol., 85: 44-51. doi: 10.1016/j.fsi.2017.10.005
- Iglesias, R., Leiro, J., Ubeira, F.M., Santamarina, M.T., Sanmartín, M.L. (1993). *Anisakis simplex*: antigen recognition and antibody production in experimentally infected mice. *Parasite Immunol.*, 15(5): 243-250. doi: 10.1111/j.1365-3024.1993.tb00607.x
- Jaafar, R.M., Chettri, J.K., Dalsgaard, I., Al-Jubury, A., Kania, P.W., Skov, J., Buchmann, K. (2015). Effects of adjuvant Montanide™ ISA 763 A VG in rainbow trout injection vaccinated against *Yersinia ruckeri*. *Fish Shellfish Immunol.*, 47: 797-806. doi: 10.1016/j.fsi.2015.10.023
- Ji, J., Torrealba, D., Ruyra, À., Roher, N. (2015). Nanodelivery systems as new tools for immunostimulant or vaccine administration: Targeting the fish immune system. *Biology (Basel)*, 4(4): 664-696. doi: 10.3390/biology4040664
- Jiang, J., Zheng, Z., Wang, K., Wang, J., He, Y., Wang, E., Chen, D., Ouyang, P., Geng, Y., Huang, X. (2015). Adjuvant immune enhancement of subunit vaccine encoding pSCPI of streptococcus iniae in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Int. J. Mol. Sci.*, 16: 28001-28013. doi: 10.3390/ijms161226082
- Kanno, K., Akiyoshi, K., Nakatsuka, T., Watabe, Y., Yukimura, S., Ishihara, H., Shin, N., Kawasaki Y., Yano D. (2012).

- Biocompatible hydrogel from a green tide-forming Chlorophyta. *J. Sust. Dev.*, 5(4): 38-45. doi: 10.5539/jsd.v5n4p38
- Kavaliauskis, A., Arnemo, M., Kim, S.H., Ulanova, L., Speth, M., Novoa, B., Dios, S., Evensen, Ø., Griffiths, G.W., Gjøen, T. (2015). Use of poly(I:C) stabilized with chitosan as a vaccine-adjuvant against viral hemorrhagic septicemia virus infection in zebrafish. *Zebrafish*, 12: 421-431. doi: 10.1089/zeb.2015.1126
- Klimka, A., Michels, L., Glowalla, E., Tosetti, B., Krönke, M., Krut, O. (2015). Montanide ISA 71 VG is advantageous to Freund's adjuvant in immunization against *S. aureus* infection of mice. *Scand. J. Immunol.*, 81(5): 291-297. doi: 10.1111/sji.12279
- Kumari, J., Bøgwald, J., Dalmo, R.A. (2013). Vaccination of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., with *Aeromonas salmonicida* and infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) showed a mixed Th1/Th2/Treg response. *J. Fish Dis.*, 36: 881-886. doi: 10.1111/jfd.12100
- Lahaye, M., Robic, A. (2007). Structure and function properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules.*, 8(6): 1765-1774. doi: 10.1021/bm061185q
- Lamas, J., Sanmartín, M.L., Paramá, A.I., Castro, R., Cabaleiro, S., Ruiz de Ocenda, M.V., Barja, J.L., 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: 10.1016/j.aquaculture.2008.03.015
- León-Rodríguez, L., Luzardo-Álvarez, A., Blanco-Méndez, J., Lamas, J., Leiro, J. (2012). A vaccine based on biodegradable microspheres induces protective immunity against scuticociliatosis without producing side effects in turbot. *Fish Shellfish Immunol.*, 33: 21-27. doi: 10.1016/j.fsi.2012.03.028
- León-Rodríguez, L., Luzardo-Álvarez, A., Blanco-Méndez, J., Lamas, J., Leiro, J. (2013). Biodegradable microparticles covalently linked to surface antigens of the scuticociliate parasite *P. dicentrarchi* promote innate immune responses in vitro. *Fish Shellfish Immunol.*, 34: 236-243. doi: 10.1016/j.fsi.2012.10.029
- Lin, S., Pan, Y., Luo, L., Luo, L. (2011). Effects of dietary β -1,3-glucan, chitosan or raffinose on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*). *Fish Shellfish Immunol.*, 31: 788-794. doi: 10.1016/j.fsi.2011.07.013
- Liu, X., Zhang, H., Gao, Y., Zhang, Y., Wu, H., Zhang, Y. (2015). Efficacy of chitosan oligosaccharide as aquatic adjuvant administrated with a formalin-inactivated *Vibrio anguillarum* vaccine. *Fish Shellfish Immunol.*, 47: 855-860. doi: 10.1016/j.fsi.2015.10.012
- Ma, Y. P., Ke, H., Liang, Z.L., Ma, J. Y., Hao, L., Liu, Z.X. (2017). Protective efficacy of cationic-PLGA microspheres loaded with DNA vaccine encoding the sip gene of *Streptococcus agalactiae*

- in tilapia. *Fish Shellfish Immunol.*, 66: 345-353. doi: 10.1016/j.fsi.2017.05.003
- Magnadóttir, B., Jónsdóttir, H., Helgason, S., Björnsson, B., Jørgensen, T., Pilström, L. (1999). Humoral immune parameters in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). I. The effects of environmental temperature. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 122: 173-180. doi: 10.1016/S0305-0491(98)10156-6
- Makrinos, D.L., Bowden, T.J. (2016). Natural environmental impacts on teleost immune function. *Fish Shellfish Immunol.*, 53: 50-57. doi: 10.1016/j.fsi.2016.03.008
- McKee, A.S., Munks, M.W., Marrack, P. (2007). How do adjuvants work? Important considerations for new generation adjuvants. *Immunity*, 27(5): 687-690. doi: 10.1016/j.immuni.2007.11.003
- McKee, A.S., Marrack, P. (2017). Old and new adjuvants. *Curr. Opin. Immunol.*, 47: 44-51. doi: 10.1016/j.coi.2017.06.005
- Miyamoto, T., Takahashi, S., Ito, H., Inagaki, H., Noishiki, Y. (1989). Tissue biocompatibility of cellulose and its derivatives. *J. Biomed. Mater. Res.*, 23(1): 125-133. doi: 10.1002/jbm.820230110
- Morelli, A., Chiellini, F. (2010). Ulvan as a new type of biomaterial from renewable resources: functionalization and hydrogel preparation. *Macromol. Chem. Phys.*, 211, 821-832. doi: 10.1002/macp.200900562

- Mutoloki, S., Alexandersen, S., Evensen, Ø. (2004). Sequential study of antigen persistence and concomitant inflammatory reactions relative to side-effects and growth of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following intraperitoneal injection with oil-adjuvanted vaccines. *Fish Shellfish Immunol.*, 16: 633-644. doi: 10.1016/j.fsi.2003.10.002
- 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 Immunol.*, 38: 244-254. doi: 10.1016/j.fsi.2014.03.020
- Opie, E.L., Freund, J. (1937). An experimental study of protective inoculation with heat killed tubercle bacilli. *J. Exp. Med.*, 66: 761-788. doi: 10.1084/jem.66.6.761
- Pereiro, P., Martinez-Lopez, A., Falco, A., Dios, S., Figueras, A., Coll, J.M., Novoa, B., Estepa, A. (2012). Protection and antibody response induced by intramuscular DNA vaccine encoding for viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) G glycoprotein in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Shellfish Immunol.*, 32: 1088-1094. doi: 10.1016/j.fsi.2012.03.004
- Petrovsky, N. (2006). Novel human polysaccharide adjuvants with dual Th1 and Th2 potentiating activity. *Vaccine*, 24(2): S2-26-9. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.01.107

- Piazzon, C., Lamas, J., Castro, R., Budiño, B., Cabaleiro, S., Sanmartín, M., Leiro, J. (2008). Antigenic and cross-protection studies on two turbot scuticociliate isolates. *Fish Shellfish Immunol.*, 25: 417-424. doi: 10.1016/j.fsi.2008.05.012
- Piazzon, M.C., Wiegertjes, G.F., Leiro, J., Lamas, J. (2011). Turbot resistance to *Philasterides dicentrarchi* is more dependent on humoral than on cellular immune responses. *Fish Shellfish Immunol.*, 30: 1339-1347. doi: 10.1016/j.fsi.2011.02.026
- Reeves, R., Ribeiro, A., Lombardo, L., Boyer, R., Leach, J.B. (2010). Synthesis and characterization of carboxymethylcellulose-methacrylate hydrogel cell scaffolds. *Polymers (Basel)*, 2: 252-264. doi: 10.3390/polym2030252
- Reza, A.T., Nicoll, S.B. (2010). Characterization of novel photocrosslinked carboxymethylcellulose hydrogels for encapsulation of nucleus pulposus cells. *Acta Biomater.*, 6(1): 179-186. doi: 10.1016/j.actbio.2009.06.004
- Riteau, N., Sher, A. (2016). Chitosan: an adjuvant with an unanticipated STING. *Immunity.*, 44(3): 522-524. doi: 10.1016/j.immuni.2016.03.002
- Robic, A., Gaillard, C., Sassi, J.F., Leral, Y., Lahaye, M. (2009). Ultrastructure of ulvan: A polysaccharide from green seaweeds. *Biopolymers*, 91: 652-664. doi: 10.1002/bip.21195
- Romagnani, S. (1997). The Th1/Th2 paradigm. *Immunol. Today*, 18(6): 263-266.

- Romagnani, S. (1999). Th1/Th2 cells. *Inflamm. Bowel Dis.*, 5(4):285-294. doi: 10.1097/00054725-199911000-00009
- Sanmartín, M.L., Paramá, A., Castro, R., Cabaleiro, S., Leiro, J., Lamas, J., Barja, J.L. (2008). Vaccination of turbot, *Psetta maxima* (L.), against the protozoan parasite *Philasterides dicentrarchi*: Effects on antibody production and protection. *J. Fish Dis.*, 31: 135-140. doi: 10.1111/j.1365-2761.2007.00876.x
- Santos, Y., García-Marquez, S., Pereira, P.G., Pazos, F., Riaza, A., Silva, R., El Morabit, A., Ubeira, F.M. (2005). Efficacy of furunculosis vaccines in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.): Evaluation of immersion, oral and injection delivery. *J. Fish Dis.*, 28: 165-172. doi: 10.1111/j.1365-2761.2005.00610.x
- Schijns, V.E.J.C., Lavelle, E.C. (2011). Trends in vaccine adjuvants. *Expert Rev. Vaccines*, 10(4): 539-550. doi: 10.1586/erv.11.21
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.*, 3: 1101-1108. doi: 10.1038/nprot.2008.73
- Secombes, C. J. (1996). The nonspecific immune system: cellular defenses. En: *The Fish Immune System: Organism, Pathogen, and Environment*. G. Iwawa y T. Nakanishi (eds). pp. 63-103. San Diego, CA. Academic Press.
- Siwicki, A.K., Anderson, D.P., Rumsey, G.L. (1994). Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Vet. Immunol.*

- Immunopathol., 41: 125-139. doi: 10.1016/0165-2427(94)90062-0
- Tafalla, C., Bøgwald, J., Dalmo, R.A. (2013). Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: Current knowledge and future perspectives. *Fish Shellfish Immunol.*, 35(6): 1740-1750. doi: 10.1016/j.fsi.2013.02.029
- Toda, T., Yoshino, S. (2016). Enhancement of ovalbumin-specific Th1, Th2, and Th17 immune responses by amorphous silica nanoparticles. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 29: 408-420. doi: 10.1177/0394632016656192
- Wang, T., Secombes, C.J. (2013). The cytokine networks of adaptive immunity in fish. *Fish Shellfish Immunol.*, 35(6): 1703-1718. doi: 10.1016/j.fsi.2013.08.030
- Wen, Z.S., Xu, Y.L., Zou, X.T., Xu, Z.R. (2011). Chitosan nanoparticles act as an adjuvant to promote both Th1 and Th2 immune responses induced by ovalbumin in mice. *Mar. Drugs*, 9: 1038-1055. doi: 10.3390/md9061038
- Xia, I.F., Cheung, J.S., Wu, M., Wong, K.S., Kong, H.K., Zheng, X.T., Wong, K.H., Kwok, K.W. (2019). Dietary chitosan-selenium nanoparticle (CTS-SeNP) enhance immunity and disease resistance in zebrafish. *Fish Shellfish Immunol.*, 87: 449-459. doi: 10.1016/j.fsi.2019.01.042
- Yaich, H., Garna, H., Besbes, S., Paquot, M., Blecker, C., Attia, H. (2013). Effect of extraction conditions on the yield and purity of

- ulvan extracted from *Ulva lactuca*. *Food Hydrocoll.*, 31: 375-382. doi: 10.1016/j.foodhyd.2012.11.013
- Yanase, N., Toyota, H., Hata, K., Yagyu, S., Seki, T., Harada, M., Kato, Y., Mizuguchi, J. (2014). OVA-bound nanoparticles induce OVA-specific IgG₁, IgG_{2a}, and IgG_{2b} responses with low IgE synthesis. *Vaccine*, 32: 5918-5924. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.08.059
- Zhang, J., Fu, X., Zhang, Y., Zhu, W., Zhou, Y., Yuan, G., Liu, X., Ai, T., Zeng, L., Su, J. (2019). Chitosan and anisodamine improve the immune efficacy of inactivated infectious spleen and kidney necrosis virus vaccine in *Siniperca chuatsi*. *Fish Shellfish Immunol.*, 89: 52-60. doi: 10.1016/j.fsi.2019.03.040
- Zhu, J., Paul, W.E. (2008). CD4 T cells: Fates, functions, and faults. *Blood*, 112: 1557-1569. doi: 10.1182/blood-2008-05-078154
- Zhu, J., Yamane, H., Paul, W.E. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu. Rev. Immunol.*, 28: 445-489. doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101212

CONCLUSIONES





Conclusiones

1. El antígeno de *Philasterides dicentrarchi* apenas modula la respuesta inmunitaria en células peritoneales libres. Las vacunas con los cuatro adyuvantes probados (Alhydrogel®, adyuvante completo de Freund, microesferas y Matrix-Q®) estimularon la expresión de genes involucrados en la adhesión celular, el citoesqueleto de actina, la apoptosis y la respuesta inflamatoria en estas células a tiempos cortos; lo que podría estar relacionado con la migración celular, la formación de agregados celulares y la muerte de neutrófilos. Por el contrario, se infraexpresaron los genes relacionados con la migración y actividad de los linfocitos y la presentación de antígeno. A partir del día uno, la respuesta cambia radicalmente, al sobreexpresarse genes relacionados con la resolución de la inflamación. Finalmente, no se encontró una relación entre la respuesta inmunitaria en las células peritoneales libres y la generación de anticuerpos.
2. La vacunación con *P. dicentrarchi* produce una pobre regulación de los genes relacionados con la respuesta inmunitaria en el bazo, incluidos los genes de las inmunoglobulinas. El bazo contiene cuatro poblaciones de células B: $IgM^+IgD^+IgT^-$, $IgM^+IgD^-IgT^-$, $IgM^-IgD^+IgT^-$, IgM^-

IgD⁺IgT⁺. Las células IgD⁺ son muy escasas. Las células IgM⁺ e IgT⁺ ocupan espacios similares, apareciendo dispersas en la pulpa roja, asociadas a vasos sanguíneos y en la zona de linfoide asociada a centros melanomacrofágicos. La vacunación genera un aumento en la cantidad y en la proliferación de células B IgM⁺ e IgT⁺, y de otros tipos celulares en la zona que rodea a los centros melanomacrofágicos, indicando una cierta analogía entre esta zona y los centros germinales de mamíferos. Por otro lado, dada la abundancia de linfocitos B, es posible que una buena parte de la respuesta inmunitaria en la vacunación intraperitoneal se genere en las masas de células y vacuna que se forman en la cavidad.

3. El rodaballo presenta dos genes del receptor de manosa de tipo 1 (*mrc1-1* y *mrc1-2*), ambos relacionados filogenéticamente con el gen *MRC1* de mamíferos. Las dos moléculas Mrc1-1 y Mrc1-2 de rodaballo presentan una organización similar, con un dominio rico en cisteína, un dominio de fibronectina tipo II, 8 dominios de lectina de tipo C, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático. Hemos diseñado un anticuerpo contra Mrc1-1 que fue capaz de reconocer la proteína en Western blot y marcar células compatibles con macrófagos en órganos linfoides de rodaballo. La mayor expresión

constitutiva de ambos genes se da en el riñón anterior y bazo. La vacunación con *P. dicentrarchi* genera una regulación positiva de ambos genes, aunque queda por establecer cuál es la función de cada uno.

4. El gen de la peroxidasa de neutrófilos de rodaballo está formado por 14 exones y 14 intrones, aunque uno de los intrones está localizado en la región 5' UTR. Esta peroxidasa presenta los mismos dominios funcionales que la mieloperoxidasa de mamíferos. Sin embargo, a pesar de encontrarse en neutrófilos y de que el rodaballo no presenta eosinófilos, esta peroxidasa presenta una mayor similitud con la peroxidasa de eosinófilos de otras especies de peces y de mamíferos que con la mieloperoxidasa. La regulación de varios genes en leucocitos de riñón anterior estimulados con la peroxidasa de neutrófilos de rodaballo sugiere que esta actúa como mediador de la respuesta inmunitaria.
5. Las vacunas elaboradas con el hidrogel formado por los polisacáridos ulvano, obtenido de *Ulva rigida*, y quitosano inducen niveles de anticuerpos y una protección en rodaballo frente a *P. dicentrarchi* similares a los obtenidos utilizando el adyuvante oleoso MontanideTM ISA 763 A VG, pero generando menos daños.





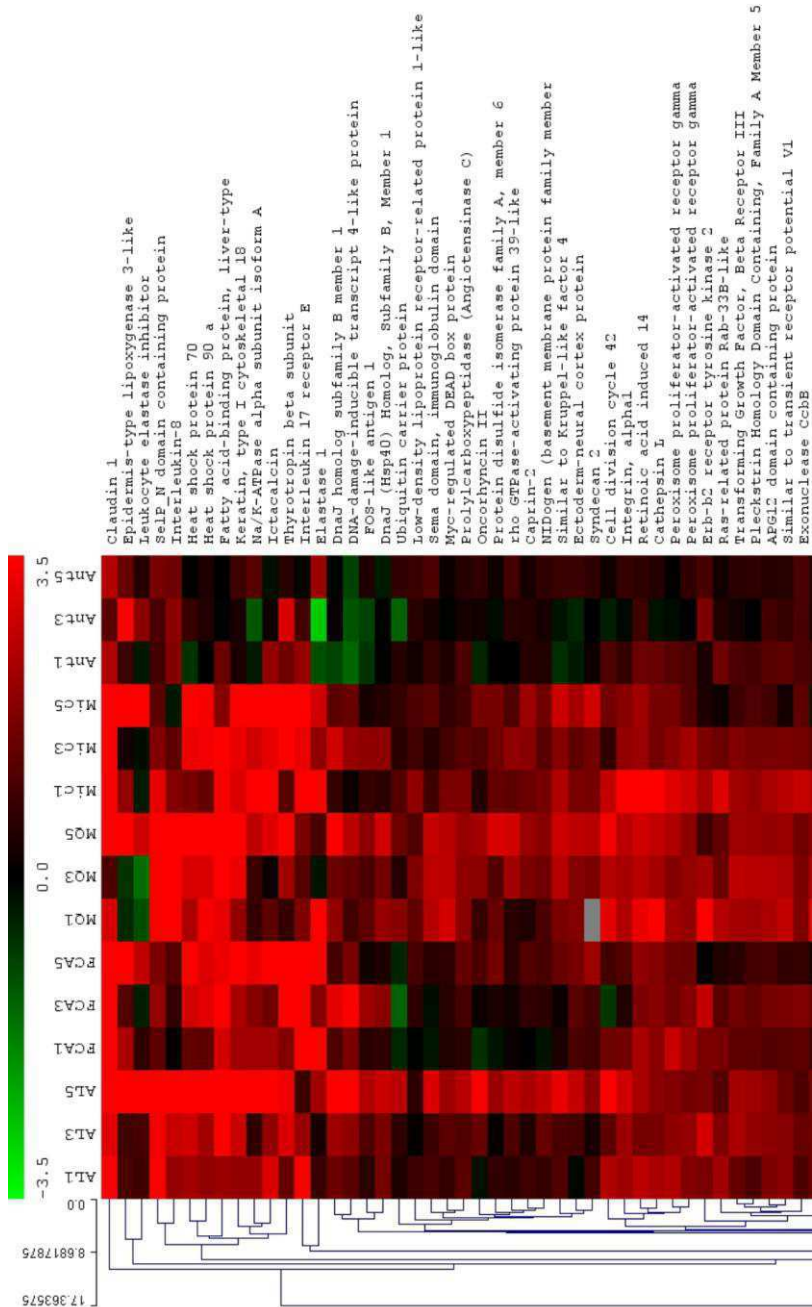
ANEXOS

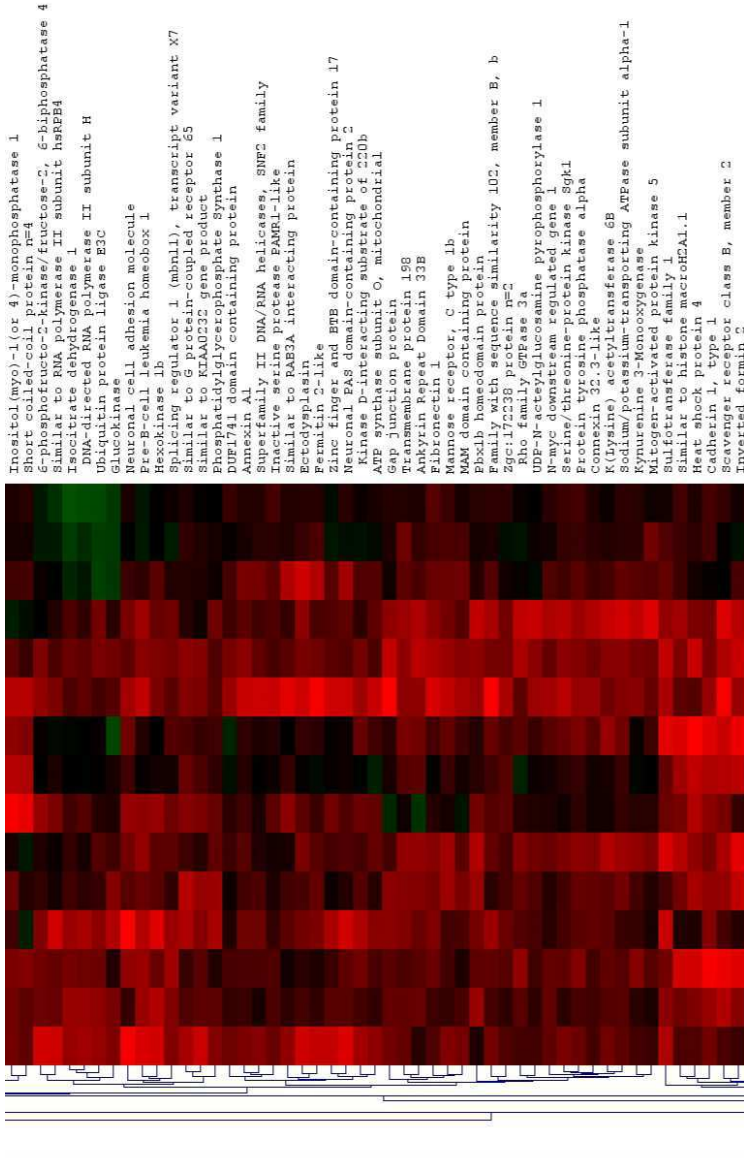


Anexos

Anexo I. Mapa de calor que muestra la agrupación jerárquica de todos los genes expresados diferencialmente (DEG). Los datos son de peces inyectados con antígeno (Ant), o con antígeno más adyuvante (Alhydrogel [Al], Freund [FCA], Matrix-Q [MQ] o microesferas [Mic]), los días 1, 3 y 5 después de la inyección. Los resultados se expresan como la tasa media de expresión (\log_2 de diferentes grupos frente a PBS). Los diferentes colores indican sobreexpresión (rojo) o infraexpresión descendente (verde).

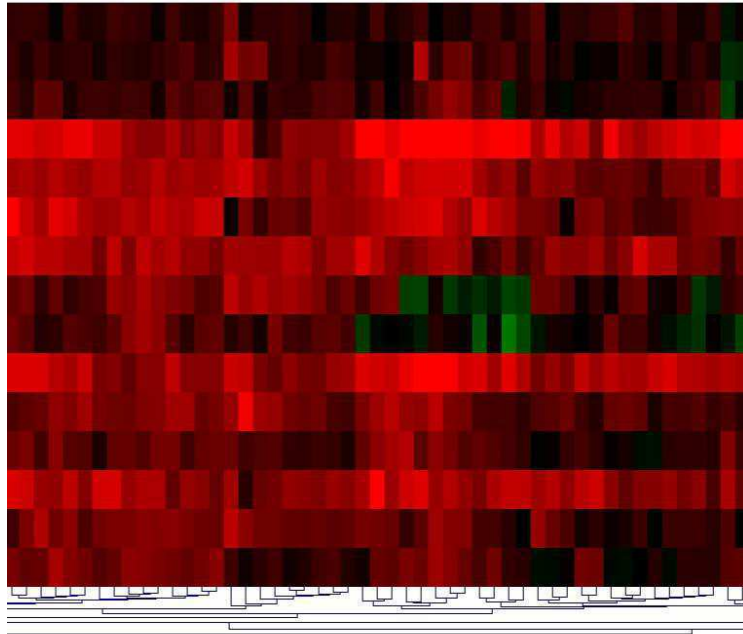


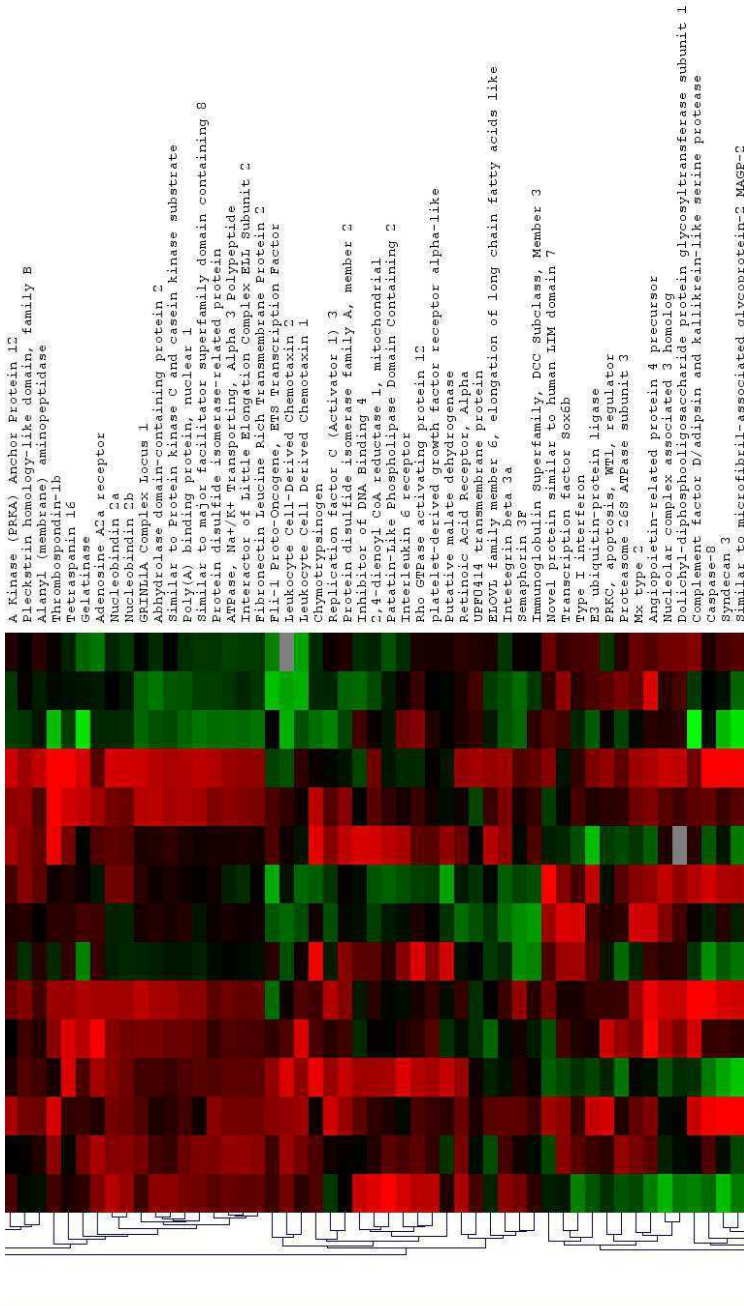


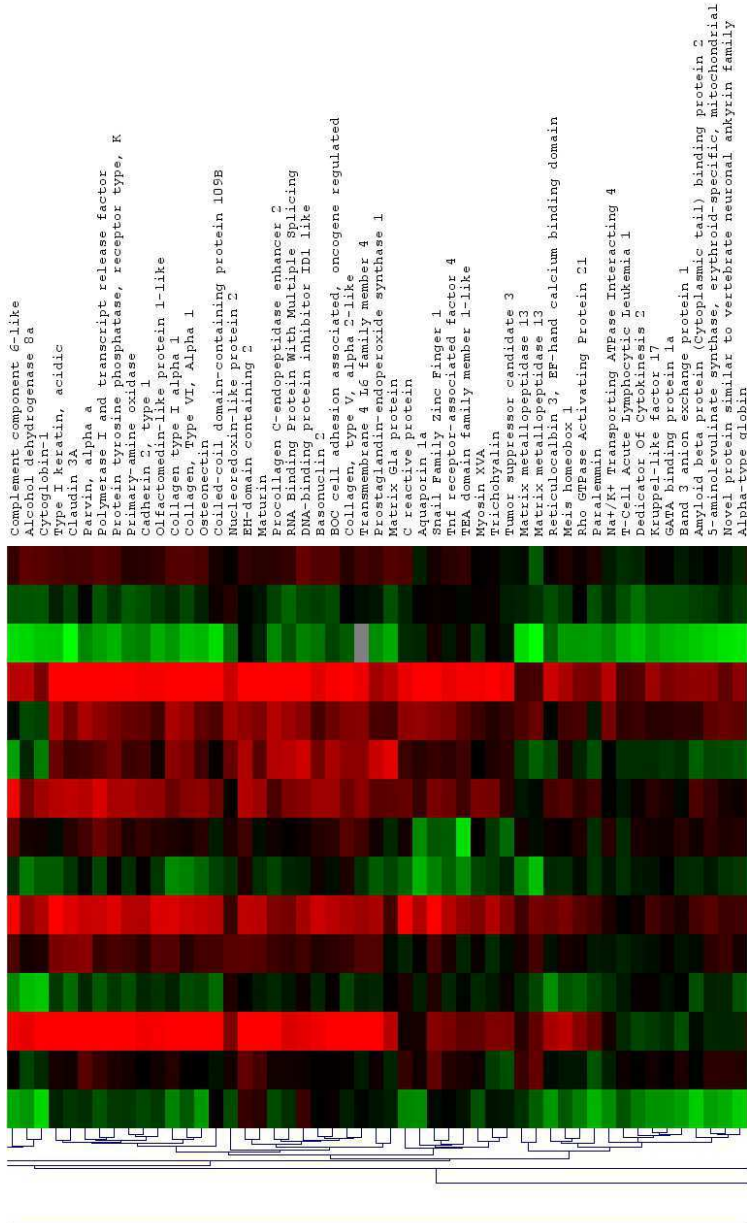


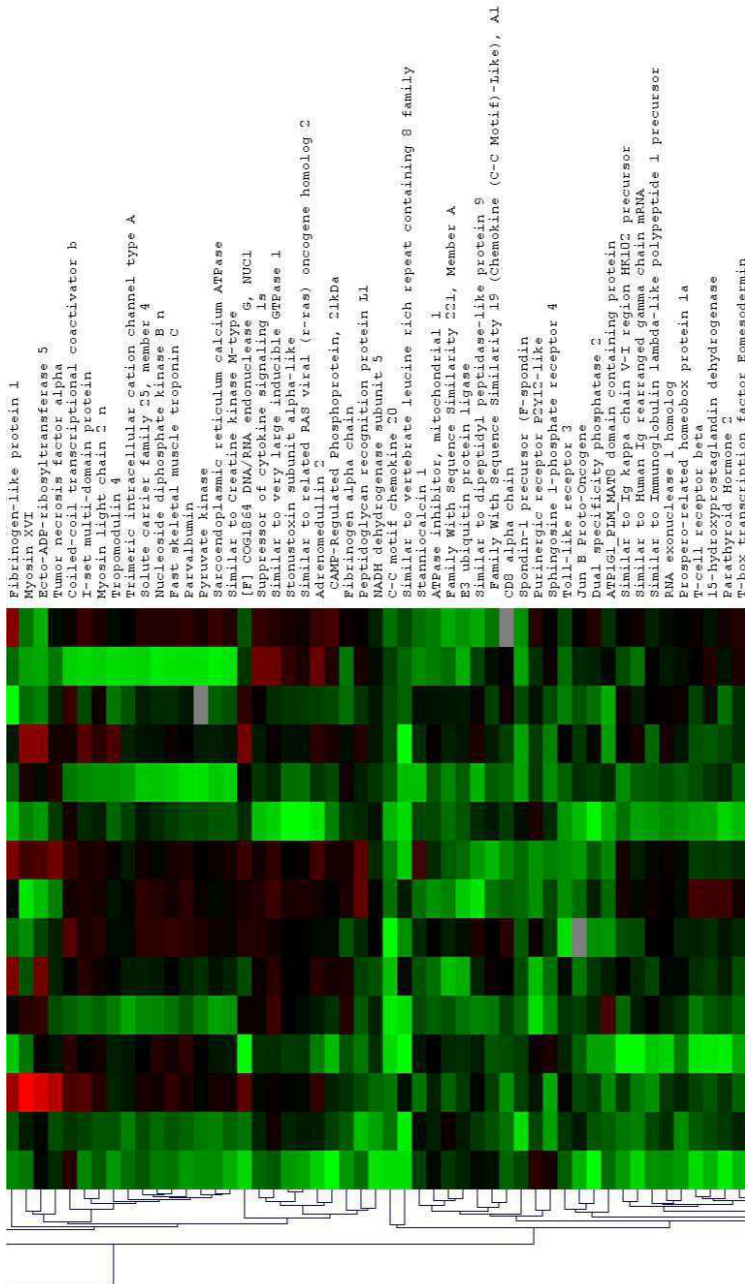
Inositol (myo)-1-(or 4)-monophosphatase 1
 Short coiled-coil protein N=4
 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-biphosphatase 4
 Similar to RNA polymerase II subunit hRPB4
 Isocitrate dehydrogenase 1
 DNA-directed RNA Polymerase II subunit H
 Chaperonin protein ligase E3C
 Neuronal cell adhesion molecule
 Pre-B-cell leukemia homeobox 1
 Hexokinase 1b
 Splicing regulator 1 (mbnl1), transcript variant X7
 Similar to G protein-coupled receptor 65
 Similar to KIAA0232 gene product
 Phosphatidylylcephosphate Synthase 1
 DUF1741 domain containing protein
 Annexin A1
 Similar to family II DNA/RNA helicases, SNF2 family
 Tyrosine phosphatase PAMR1-like
 Similar to RAB3A interacting protein
 Ectodysplasin
 Fermitin 2-like
 Zinc finger and BTE domain-containing protein 17
 Neuronal PAS domain-containing protein 2
 Kinase D-interacting substrate of 220b
 ATP synthase subunit O, mitochondrial
 Gap junction protein
 Transmembrane protein 158
 ATP synthase subunit O, mitochondrial
 Fibronectin 1
 Mannose receptor, C type 1b
 MAM domain containing protein
 Pbx1b homeodomain protein
 Family with sequence similarity 102, member B, b
 Zgc:172238 protein N=2
 Rho family GTPase 3a
 UDE-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1
 3-myc downstream regulated gene
 Similar to protein tyrosine phosphatase Sgk1
 Protein tyrosine phosphatase alpha
 Connexin 32.3-like
 K(Lysine) acetyltransferase 6B
 Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1
 Kynurenine 3-Monooxygenase
 Mitogen-activated protein kinase 5
 Sulfotransferase family 1
 Similar to histone macroH2A1.1
 Heat shock protein 4
 Sathurin 1, type 1
 Similar to class B, member 2
 Inverted formin C

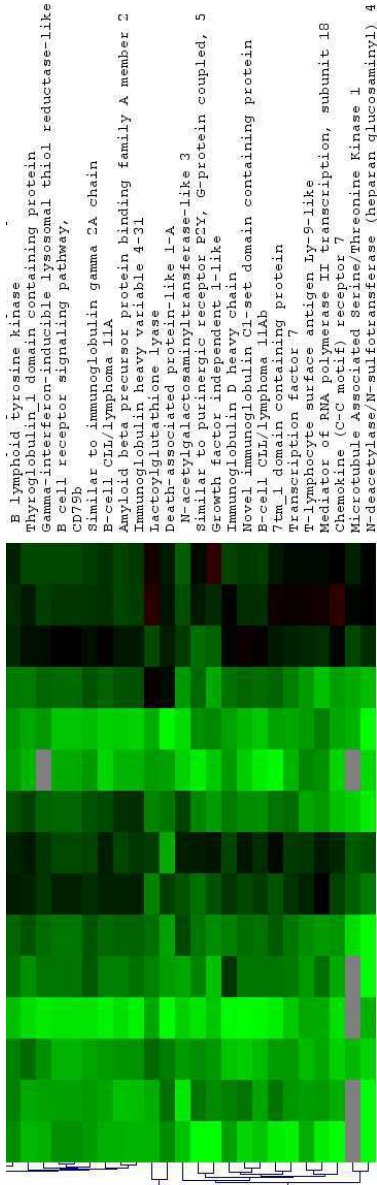
Annexin A2
 Electin 11 isoform 1
 24-dehydrocholesterol reductase
 Annexin A13
 EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 2
 Profilin 2
 Myosin 1c
 Similar to CDC42 effector protein
 Fork_head_N domain containing protein
 Glycerol transferase-like 1B
 3-beta-hydroxysteroid-Delta8
 Absent In Melanoma 1
 Macrophage capping protein
 S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase
 Sacsin molecular chaperone
 CC chemokine 3
 Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1
 Cytochrome P-450 3A12
 Histidine kinase
 CD27 Binding Motif, Single Stranded Interacting Protein 2
 CD27
 Frag1 domain containing protein
 Electin 1-like
 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2
 Ribosomal L41 domain containing protein
 Similar to K-Cl cotransporter
 Eiszo-type mechanosensitive ion channel component 2
 transglutaminase 2b
 Adenylyltransferase and sulfuryltransferase MOC53/UBA4
 Clathrin, heavy chain-like 1
 Clathrin, heavy chain
 Electin 1 domain containing protein 3
 Tissue factor pathway inhibitor a
 Amyloid beta (A4) precursor-like protein
 Desmoplakin
 Galactin-3-binding protein
 Lysyl hydroxylase 1
 Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor (GEF) 15
 Breast Cancer Anti-Estrogen Resistance 3
 Similar to Immunoglobulin superfamily, member 21
 Leptidyl arginine deaminase, type I
 Fc gamma 1c antigen
 Heat shock protein 10
 RNA pol 3 Rfc31 multi-domain protein
 Low-Density Lipoprotein (LDL) Receptor
 DUP1777 domain containing protein
 UDP-glucose dehydrogenase
 Filamin A, alpha
 CDC42 Effector Protein (Rho GTPase Binding)
 Calcitonin receptor-like











B lymphoid tyrosine kinase
 Myoglobin domain containing protein
 Gamma interferon-inducible lysosomal thiol reductase-like
 B cell receptor signaling pathway,
 CD79b
 Similar to immunoglobulin gamma 2A chain
 B-cell CLL/lymphoma 11A
 Amyloid beta precursor protein binding family A member 2
 Immunoglobulin heavy variable 4-31
 Lactoylglutathione lyase
 Death-associated protein-like 1-A
 N-acetylgalactosaminyltransferase-like 3
 Similar to purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 5
 Growth factor independent 1-like
 Immunoglobulin D heavy chain
 Novel immunoglobulin C1-set domain containing protein
 B-cell CLL/lymphoma 11Aa
 7tm_1 domain containing protein
 transcription factor 7
 T-Lymphocyte surface antigen Ly-9-like
 Mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 18
 Chemokine (C-C motif) receptor 7
 Microtubule Associated Serine/Threonine Kinase I
 N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 4

Anexo II. Lista de genes expresados diferencialmente (DEG), agrupados según las actividades celulares, los procesos metabólicos, vías de señalización, etc., en los que participan, basada en el análisis de genomas y genes de la enciclopedia Kyoto (KEGG, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Los resultados se muestran para los DEG en todos los grupos de peces vacunados.



hsa00051	Fructose and mannose metabolism	PFKFB4
hsa00512	O-Glycan biosynthesis	GALNT3
hsa04916	Melanogenesis	TCF7
hsa04540	Gap junction	GJA1
hsa04950	Maturity onset diabetes of the young	GCK
hsa00562	Inositol phosphate metabolism	INPP5J
hsa05210	Colorectal cancer	TCF7
hsa05014	Amnycrotrophic lateral sclerosis (ALS)	MAP3K5
hsa00020	Citrate cycle (TCA cycle)	IDH1
hsa03050	Proteasome	PSMC3
hsa05110	Vibrio cholerae infection	PDI4A
hsa04672	Intestinal immune network for IgA production	CCR9
hsa00590	Arachidonic acid metabolism	PTGS1
hsa04664	Fc epsilon RI signaling pathway	VAV2
hsa03420	Nucleotide excision repair	RFC3
hsa00410	beta-Alanine metabolism	AOC3
hsa04070	Phosphatidylinositol signaling system	INPP5J
hsa05416	Viral myocarditis	CASP8
hsa04012	ErbB signaling pathway	ERBB2
hsa00071	Fatty acid metabolism	ADH6
hsa04115	p53 signaling pathway	CASP8
hsa00310	Lysine degradation	PLOD1
hsa04614	Renin-angiotensin system	ANPEP
hsa00330	Arginine and proline metabolism	CKM
hsa03040	Spliceosome	BCAS2
hsa04150	mTOR signaling pathway	DDIT4
hsa04622	RIG-I-like receptor signaling pathway	CASP8
hsa00052	Galactose metabolism	GCK
hsa00920	Sulfur metabolism	PAPSS2
hsa00564	Glycerophospholipid metabolism	PGS1
hsa00830	Retinol metabolism	ADH6
hsa00510	N-Glycan biosynthesis	RPN1
hsa05218	Melanoma	CDH1



