



Universidad
Católica de
Valencia
San Vicente Mártir

TFG

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN
CIENCIAS DEL MAR

Respuesta inmunitaria humoral y celular de la dorada frente al ectoparásito *Sparicotyle chrysophrii* (Van Beneden & Hesse, 1863)

Alumno Elena Gimeno Bañón

Tutores Itziar Estensoro Atienza, Ana María Hernández Martínez, María Carla Piazzon de Haro

Curso académico 2021/2022



Facultad de Veterinaria
y Ciencias Experimentales
Universidad Católica de Valencia
San Vicente Mártir

ÍNDICE

RESUMEN	III
PALABRAS CLAVE.....	III
ABSTRACT	IV
KEY WORDS	IV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. La acuicultura y la producción de dorada	1
1.2. Enfermedades parasitarias de la dorada	4
1.3. Sistema inmunitario en peces	8
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIAL Y MÉTODOS	11
3.1. Peces y diseño experimental	11
3.2. Análisis de IgM total mediante ELISA en muestras de sueros	12
3.3. Análisis de IgT total mediante ELISA en muestras de sueros	14
3.4. ELISA específico IgM anti-<i>S. chrysophrii</i> para sueros	15
3.5. Marcaje por inmunohistoquímica de células B (mediante Pab anti-IgM) y granulocitos acidófilos (mediante Mab anti-G7) en branquia	16
3.6. Análisis cuantitativo al microscopio óptico de las poblaciones celulares marcadas	17
3.7. Análisis estadístico de los datos	18
4. RESULTADOS	19
4.1. ELISA anti-IgM total	19
4.2. ELISA anti-IgT total	21
4.3. ELISA específico IgM anti-<i>S. chrysophrii</i>	24
4.4. Recuentos de células inmunorreactivas	27
5. DISCUSIÓN.....	35
6. CONCLUSIONES	40
7. LÍNEAS FUTURAS	41
8. BIBLIOGRAFÍA Y WEBGRAFÍA	42

Índice de figuras

Figura 1. Fuentes de producción de organismos acuáticos a nivel mundial	1
Figura 2. Dorada, <i>Sparus aurata</i> (Linnaeus, 1758).....	3
Figura 3. Producción de dorada en España, Europa y el mundo a partir de 1958.....	4
Figura 4. Ciclo vital de <i>Sparicotyle chrysophrii</i>	7
Figura 5. IgM total circulante mediante ELISA de doradas Naive y Reexpuestas después de la exposición a <i>Sparicotyle chrysophrii</i>	20
Figura 6. Diferencia de los valores medios de IgM total en circulación de doradas Naive (NAI) y Reexpuestas (RE) después de la exposición a <i>Sparicotyle chrysophrii</i> por ELISA, en los muestreos M0, M1 y M2.....	21
Figura 7. IgT total de doradas Naive y Reexpuestas después de la exposición a <i>Sparicotyle chrysophrii</i> medida por ELISA.....	23
Figura 8. Diferencia de los valores medios de IgT total en suero de doradas Naive (NAI) y Reexpuestas (RE) después de la exposición a <i>Sparicotyle chrysophrii</i> por ELISA en los muestreos M0, M1 y M2.....	24
Figura 9. IgM específica en circulación de doradas Naive y Reexpuestas después de la exposición a <i>Sparicotyle chrysophrii</i> por ELISA.	25
Figura 10. Diferencia de los valores medios de IgM específica anti- <i>Sparicotyle chrysophrii</i> en circulación de doradas Naive (NAI) y Reexpuestas (RE) después de la exposición al parásito por ELISA.	26
Figura 11. Cuantificación media de células IgM+ en branquia de dorada, según su intensidad de infección con <i>Sparicotyle chrysophrii</i>	28
Figura 12. Cuantificación media de células IgM+ en branquia de dorada, según su estado de infección, expuestos a <i>Sparicotyle chrysophrii</i>	29
Figura 13. Cuantificación media de células G7+ en branquia de dorada, según su intensidad de infección.	30
Figura 14. Cuantificación media de células G7+ en branquia de dorada, según su estado de infección, diferenciando entre controles (CTRL) y receptores (RCPT).....	31
Figura 15. Granulocitos acidófilos G7+ (A, C, E, G) y células B IgM+ (B, D, F, H) en branquias de doradas control no expuestas al parásito (A, B), con intensidad de infección baja por <i>Sparicotyle chrysophrii</i> (C, D), intensidad media (E, F) e intensidad alta (G, H)..	32
Figura 16. Detalles de los granulocitos acidófilos G7+ (A, C, E) y células B IgM+ (B, D, F) en branquias de doradas con alta intensidad de infección por <i>Sparicotyle chrysophrii</i>	33

Índice de tablas

Tabla 1. Diseño experimental mostrando los días de exposición al parásito en los que tuvieron lugar los muestreos (M0, M1 y M2), el número de peces que se sacrificó en cada uno de ellos para la toma de muestras de doradas naive (NAI) y reexpuestas (RE) a <i>S. chrysophrii</i> y la intensidad de infección (Int.Inf) media	11
Tabla 2. Selección de muestras de tejidos fijados en Bouin para el marcaje inmunohistoquímico.	12
Tabla 3. Distribución de los sueros y controles en las placas multipocillo.	14
Tabla 4. Selección de muestras de tejidos fijados en formol para el marcaje inmunohistoquímico. Las muestras de doradas naive (NAI) y reexpuestas (RE) a <i>S. chrysophrii</i> pertenecen a 3 muestreos (M0, M1 y M2).	16
Tabla 5. Medias de las células IgM+ y G7+ recontadas en los 10 campos observados al microscopio con una magnificación x400, en branquias de doradas control no expuestas (CTRL) y expuestas a <i>Sparicotyle chrysophrii</i>	27

RESUMEN

El estudio de los mecanismos inmunológicos frente a infecciones es un paso fundamental para el desarrollo de medidas de control de las patologías. En este trabajo, se ha estudiado la respuesta inmunitaria humoral primaria y secundaria, y la respuesta celular de la dorada (*Sparus aurata*) frente al parásito branquial *Sparicotyle chrysophrii*.

Se analizó la respuesta de anticuerpos circulantes en sueros de doradas naive, nunca expuestas al parásito, y supervivientes de una infección previa, durante una segunda exposición. Mediante ELISA, se detectaron los títulos de IgM totales y específicas, e IgT totales. Solo en los reexpuestos se recuperó la bajada inicial de IgM total en el último muestreo y la IgM específica respondió aumentando progresivamente. La IgT total descendió igualmente en ambos grupos.

En las branquias de doradas naive clasificadas según su intensidad de infección, se inmunomarcaron y cuantificaron las células B IgM+ y granulocitos acidófilos, implicados en la respuesta local. El número de granulocitos acidófilos fue significativamente mayor en peces infectados y presentó correlación positiva con la intensidad de infección. No se observó respuesta de células B IgM+.

En conclusión, las doradas reexpuestas generan una respuesta inmune humoral adaptativa, que implica un aumento de IgM+ específica y total en circulación. Esta respuesta específica y protectora en peces reexpuestos se activa al mes de la reexposición, y se traduce en intensidades de infección menores. Por otro lado, en las doradas naive hay reclutamiento de granulocitos acidófilos en branquias indicando la activación a nivel local de una respuesta celular innata.

PALABRAS CLAVE

Sparicotyle chrysophrii; dorada; respuesta inmune humoral y celular; ELISA; inmunohistoquímica; acuicultura.

ABSTRACT

The study of immunological mechanisms against infections is a fundamental step for the development of control measures against diseases. In this work, the primary and secondary humoral immune response and the cellular response of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) against the gill parasite *Sparicotyle chrysophrii* have been studied.

The circulating antibody response was analyzed in sera of naive gilthead sea bream, never exposed to the parasite, and survivors of a previous infection, during a second exposure. Total and specific IgM and total IgT titers were detected by ELISA. Only in re-exposed fish, the initial drop of total IgM was recovered in the last sampling and the specific IgM responded by increasing progressively. Total IgT decreased in both groups equally.

In the gills of naive gilthead sea bream classified according to their intensity of infection, IgM+ B cells and acidophilic granulocytes, involved in the local response, were immunolabeled and quantified. The number of acidophilic granulocytes was significantly higher in infected fish and was positively correlated with the intensity of infection. No IgM+ B cell response was observed.

In conclusion, re-exposed gilthead sea bream generate an adaptive humoral immune response, which implies an increase of specific and total circulating IgM+. This specific and protective response in re-exposed fish is activated one month after re-exposure, and results in lower infection intensities. On the other hand, there is recruitment of acidophilic granulocytes in gills of naïve gilthead sea bream indicating local activation of an innate cellular response.

KEY WORDS

Sparicotyle chrysophrii; gilthead sea bream; humoral and cellular immune response; ELISA; immunohistochemistry; aquaculture.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La acuicultura y la producción de dorada

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2018), “La acuicultura es el cultivo de organismos acuáticos, incluidos peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas. La acuicultura implica alguna forma de intervención en el proceso de crianza para mejorar la producción, como repoblación regular, alimentación, protección contra depredadores, etc.”.

Hoy en día, a causa de la alta demanda global de alimentos de origen marino, y siendo la pesca una opción no sostenible y limitada, surge la acuicultura como la mejor opción para abastecer a la población en el futuro (Subasinghe et al., 2009). Mirando en una escala global, el aumento de la producción acuícola ha sido extremadamente rápido durante los últimos años (Figura 1), en paralelo al crecimiento de la población mundial, y supera desde hace algunos años a la pesca extractiva.

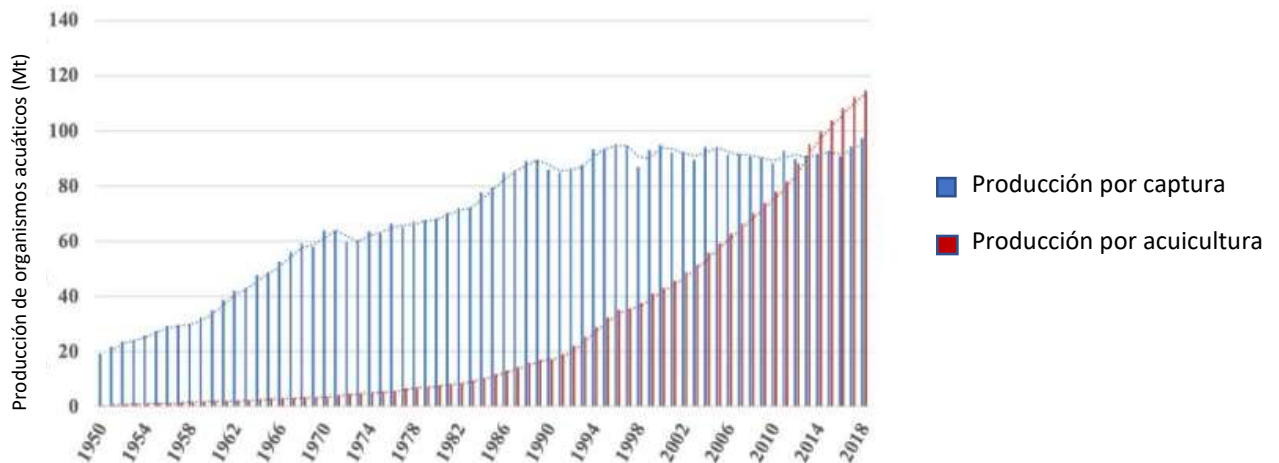


Figura 1. Fuentes de producción de organismos acuáticos a nivel mundial: acuicultura (barras rojas) y capturas (barras azules). Abreviatura: Mt, Millones de toneladas. (Datos de FAO, 2019).

La FAO publicó en 2018 que el 54.1% de los productos marinos consumidos por la población eran originados por la acuicultura, y para 2050 se necesitará duplicar la producción real para sostener la demanda (Stentiford et al., 2017; Waite et al., 2014).

El gran triunfo de la acuicultura moderna se centra en el mayor conocimiento de la biología de las especies marinas, tanto en su reproducción como alimentación. Pero este triunfo se ha visto

obstaculizado por patógenos emergentes que se distribuyen y proliferan rápidamente en las instalaciones de las piscifactorías (Rigos & Katharios, 2009; Shinn et al., 2015). Las producciones masivas en pequeños recintos o jaulas, añadiendo el aumento de las temperaturas causadas por el calentamiento global, actúan en conjunto aumentando y facilitando la propagación de enfermedades infecciosas en las piscifactorías (Antonio & Hedrick, 1995; Costello, 2006; Karvonen et al., 2010; Okamura et al., 2015; Rintamäki-Kinnunen et al., 1997; Yanagida et al., 2006).

Estas infecciones se han convertido en un problema muy relevante en los peces de cultivo, afectando el bienestar animal (Iwanowicz, 2011), a través de morbilidad o mortalidad directa, limitando la producción (Sindermann, 1987), y causando pérdidas económicas para el sector (Meyer, 1991; Monir et al., 2015; Shinn et al., 2015; Tavares-Dias & Martins, 2017).

En cuanto a las enfermedades bacterianas y virales se han estudiado y analizado ampliamente, pero en cambio, los parásitos no han tenido tanta atención. En la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), la cantidad de artículos de investigación encontrados sobre enfermedades bacterianas y virales en la acuicultura es 3.6 y 3.1 veces mayor, respectivamente, que la de los parásitos. Expuesto lo anterior, existe la necesidad de dedicar esfuerzos de investigación centrados en las infecciones parasitarias, ya que siguen siendo una limitación esencial para la producción de la acuicultura sostenible.

La dorada, *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758), es la especie de pez en la que se centra este Trabajo de Fin de Grado (TFG). La dorada es un pez teleósteo marino que pertenece a la Familia Sparidae, dentro del Orden Perciformes. Este pez costero vive tanto en fondos de algas como rocosos, pero también se podría encontrar en fondos arenosos. Por norma general, los peces jóvenes residen a poca profundidad, hasta los 30 metros, sin embargo, los adultos pueden llegar a aguas mucho más profundas, hasta una profundidad máxima de 150 metros.

La dorada es una especie común en el Mar Mediterráneo. Se distribuye a lo largo de las costas del Atlántico oriental desde Gran Bretaña hasta Senegal, y raramente se encuentra en el Mar Negro (FAO, 2018). Debido a sus hábitats eurihalinos (rango de tolerancia 3-70 ‰) y euritermales (rango de tolerancia 5°C - 33°C), la dorada se ubica tanto en aguas salobres, que pueden ser áreas estuarinas y lagunas costeras, como en ambientes marinos. La eclosión y las etapas iniciales de su ciclo de vida ocurren en mar abierto durante el invierno y los alevines migran al inicio de la primavera a las aguas cercanas a la costa, donde las temperaturas son más suaves y hay mayor cantidad de alimento. A finales de otoño, los adultos vuelven al mar abierto

para reproducirse. Por norma general los alevines suelen ser más sociables mientras que los adultos muestran un comportamiento más solitario.

La dorada es carnívora y se alimenta de pequeños peces, moluscos y cefalópodos. En su primer año de vida pueden crecer hasta los 350 gramos, y los ejemplares más grandes alcanzan pesos de 8 kilogramos y 70 centímetros de longitud. Las principales características físicas de la dorada son cuerpo ovoide y comprimido lateralmente, de color gris plateado, y con una franja dorada entre los ojos (Figura 2). La dorada es hermafrodita protándrica, creciendo como machos los primeros uno o dos años de vida hasta los 30 centímetros, y cambiando a hembra cuando alcanza tallas entre 33 y 40 centímetros.



Figura 2. Dorada, *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758). Fuente: European Commission, Official Website, 2018.

El ciclo de vida completo de la dorada en cautividad se logró por primera vez en España, en la 'Planta de Cultivos Marinos' del Instituto Español de Oceanografía en Lo Pagán (IEO, Murcia, España) (Odai et al., 1978; Ortega et al. al., 1973), y también en Francia e Italia a principios de los 80 (Cameron, 2003). Las técnicas de producción comenzaron a mejorar en los años siguientes, y en la década de los noventa las piscifactorías empezaron a producir suficientes peces para hacer frente a la creciente demanda (Moretti et al., 1999). Al principio el engorde se realizaba en estanques y esteros de forma extensiva y semi intensiva. Con el paso del tiempo y de forma progresiva, los cultivos fueron aumentando y se desarrollaron instalaciones nuevas para el cultivo intensivo en el interior.

Esta especie se produce principalmente en el Mar Mediterráneo, además de cultivarse en el Mar Negro, Mar Árabe, Mar Rojo y Golfo Pérsico. La FAO en 2018 hace una estimación de la

producción mundial de dorada en 237 kilotoneladas y casi el 80% de éstas, que equivaldría a 182 kilotoneladas, se ubica en países asiáticos y europeos. Dentro de los países europeos, Grecia es el mayor productor de dorada con un 57,8%, seguido de España, 18,8% e Italia 8,9%. En un marco global, los dos principales productores son Turquía y Grecia, que representan el 35,6% y el 23,9%, respectivamente, de la producción mundial de esta especie.

La Figura 3 refleja la producción en toneladas de *S. aurata* (FAO, 2018).

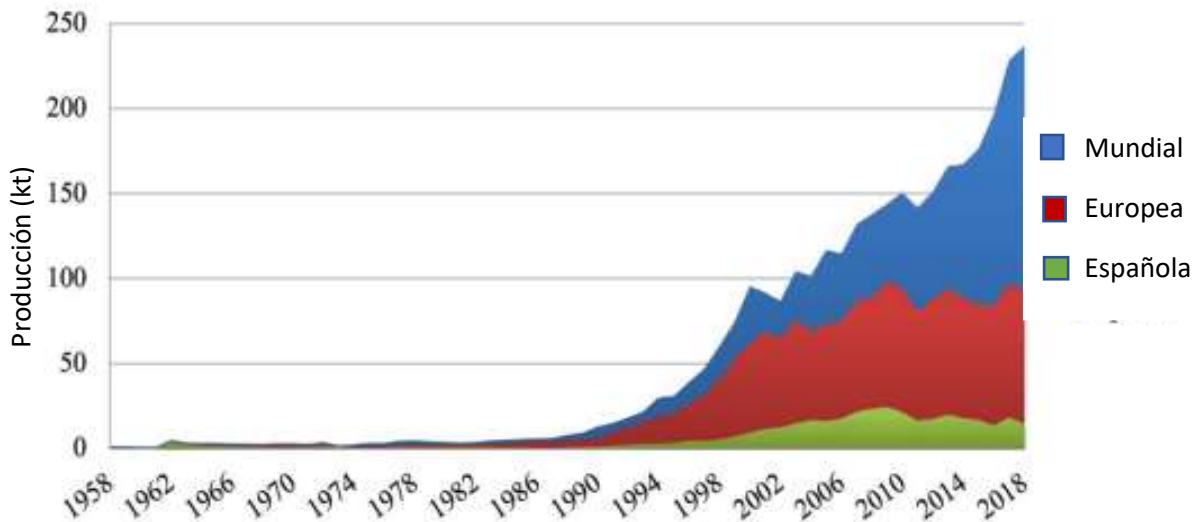


Figura 3. Producción de dorada en España, Europa y el mundo a partir de 1958. Abreviatura: kt, miles de toneladas. (Datos de FAO, 2019).

1.2. Enfermedades parasitarias de la dorada

Algunas enfermedades parasitarias, con diversos grados de importancia, han sido estudiadas en esta especie. Las doradas son susceptibles a ectoparásitos que afectan branquias y/o piel y endoparásitos que afectan varios órganos internos. Entre los ectoparásitos se encuentran, los ciliados como *Trichodina spp.* afectando branquias y piel (Álvarez Pellitero et al., 1995), o escuticociliados en heridas, branquias y cavidad bucal (Fioravanti et al., 2006); flagelados como *Amyloodinium ocellatum* (Paperna, 1980) en branquias y piel; platelmintos como *Sparicotyle chrysophrii* en branquias (Faisal & Imam, 1990); y crustáceos como *Ceratothoa oestroides* y *C. parallela* (Mladineo, 2003; Papapanagiotou & Trilles, 2001). Este TFG se centra en el estudio del efecto del monogéneo branquial *Sparicotyle chrysophrii* (Van Bebeden & Hesse, 1863).

Los parásitos incluyen organismos metazoos y protozoos. Para los metazoos, como el parásito de interés en este estudio, el hecho de estar filogenéticamente más cerca de los hospedadores

dificulta la elección de dianas diagnósticas, terapéuticas y de vacunación específicas. Por ello, existen escasos tratamientos efectivos contra estos parásitos en acuicultura. En consecuencia, la prevención a través de la desinfección y limpieza de las instalaciones, combinado con los planes de vigilancia, son una de las mejores alternativas para reducir sus efectos nocivos.

En cuanto al impacto de los parásitos sobre la acuicultura, se estima que las pérdidas económicas por enfermedades infecciosas representan un 20% del valor de la producción, y los parásitos son cada vez más responsables de ellas (Shinn et al., 2015). En la acuicultura del Mediterráneo, una de las principales enfermedades que amenaza la producción de dorada se debe al ectoparásito en cuestión, *Sparicotyle chrysophrii* (Mladineo, 2018). La mortalidad habitualmente aparece cuando la prevalencia y la intensidad son altas, dependiendo también de otros factores bióticos y abióticos, como la edad, las condiciones del agua, el manejo en la granja, etc. Aunque los niveles de infección pueden variar según la ubicación geográfica, se puede considerar a este ectoparásito como el principal problema parasitario generalizado en el cultivo de *S. aurata*, sin embargo, su impacto económico real aún no ha sido cuantificado.

Este parásito se ancla a los filamentos branquiales con un haptor poliopistocotíleo que produce efectos histopatológicos como hemorragias, necrosis y obliteración de filamentos por los puntos de inserción de los ganchos y pinzas, acortamiento lamelar, acropaquías y sinequias, proliferación del tejido epitelial con la consiguiente fusión de las lamelas secundarias, y una marcada presencia de células de cloruro y desprendimiento de células epiteliales (Paperna & Baudin Laurencin, 1977; Sitjà-Bobadilla & Álvarez-Pellitero, 2009; Mahmoud et al., 2014). El principal signo clínico es la anemia severa, que se aprecia macroscópicamente como branquias pálidas o blanquecinas, debido a la naturaleza hematófaga de este parásito (Riera-Ferrer et al., 2021). De Vico et al. (2008) observaron un aumento dramático en el tamaño y número de centros de melanomacrófagos en el bazo de peces infectados, relacionado con los cambios inducidos por la anemia. Los estudios previos en infecciones naturales y experimentales han demostrado que existe una clara correlación negativa entre la carga parasitaria y algunos valores hematológicos como el contenido de hemoglobina (Hb) en una determinada población de peces (Sitjà-Bobadilla & Álvarez-Pellitero, 2009). Esto también ha sido reportado por otros autores (Henry et al., 2015; Riera-Ferrer et al., 2021).

Otros signos clínicos son el letargo y la emaciación, que se asocian con la anemia, el fallo respiratorio y un estado general de debilidad en los peces. Esto se debe en parte a la disminución del consumo de alimento (anorexia) y al empeoramiento de la Tasa de Conversión Alimenticia (TCA). Algunas estimaciones atribuyen una disminución de 0,3-0,4 de TCA debido a infecciones

de *Sparicotyle* en la producción de dorada en el Mediterráneo, lo que se traduciría en casi 50.000 toneladas de consumo adicional de alimento (Dr. G. Rigos, HCMR, comunicación personal). Sin embargo, estos datos no han sido registrados sistemáticamente.

Los gusanos parásitos, incluidos los platelmintos, son una preocupación humana y veterinaria en todo el mundo, ya que tienen un impacto dramático sobre la salud y el bienestar humanos y un impacto económico severo sobre el ganado. Sin embargo, es importante destacar que *S. chrysophrii* no implica ningún riesgo para la salud de humanos. A pesar de esta gran importancia, el descubrimiento de fármacos antihelmínticos ha sido tradicionalmente el pariente pobre de la industria farmacéutica (Holden-Dye & Walker, 2007). Parte de esto se explica por la alta efectividad y seguridad de los compuestos desarrollados en 1960-1980, algunos de los cuales todavía son ingredientes farmacológicos activos (IFA) primarios utilizados para la helmintiasis humana y animal (McKellar & Jackson, 2004). Algunos de estos fármacos son antihelmínticos de amplio espectro, siendo efectivos contra gusanos planos parásitos y nematodos, mientras que la mayoría de los productos tienen una acción más limitada contra ciertos tipos de gusanos, según su mecanismo de acción (MDA) (Holden-Dye & Walker, 2007).

En los últimos años, el crecimiento de las prácticas agrícolas intensivas y la expansión del mercado de mascotas en los países desarrollados, junto con la creciente preocupación por el problema global de la resistencia a los antihelmínticos (Kaplan & Vidyashankar, 2012), han liderado los esfuerzos para refinar las moléculas existentes y la forma de administrarlas, además de la motivación de las empresas del sector de la salud animal para emprender nuevos programas de descubrimiento de fármacos (Enejo & Suleiman, 2017). De hecho, las ventas de antihelmínticos comprenden actualmente el sector más grande de la industria farmacéutica animal por volumen y valor (Epe & Kaminsky, 2013).

Actualmente el único tratamiento disponible para el control de *S. chrysophrii* en la dorada es el baño de formalina, con una formulación comercial registrada en España (Aquacen 380 mg/l, Cenavisa). Como fuerte desinfectante con actividad biocida de amplio espectro, la formalina es eficaz contra la mayoría de los parásitos protozoos y metazoos externos (Leal et al. 2018) y se ha utilizado ampliamente para el control de monogéneos en acuicultura.

Los resultados experimentales *in vitro* han demostrado que un baño de 30 min en formalina (300 ppm) es 100 % efectivo para huevos, larvas oncomiracidias y adultos de *S. chrysophrii*, mientras que el peróxido de hidrógeno (200 ppm) es 100 % efectivo para oncomiracidios y adultos, pero no se determina la eficacia contra los huevos (Sitjà-Bobadilla et al., 2006). Las diferentes fases del ciclo de *S. chrysophrii* se muestran en la Figura 4.

Sin embargo, el uso de formalina en mar abierto, como se necesita en las granjas de dorada, plantea múltiples problemas ambientales y de seguridad laboral, además de enormes costes operativos. Asimismo, la formalina es bastante tóxica para los peces y la vida marina, y el margen entre la exposición necesaria para la eficacia parasiticida y la inducción de efectos negativos graves es bastante estrecho (Leal et al., 2018). Como consecuencia, el uso de formalina en mar abierto ya está prohibido en algunos países y probablemente se prohibirá en Europa en el futuro.

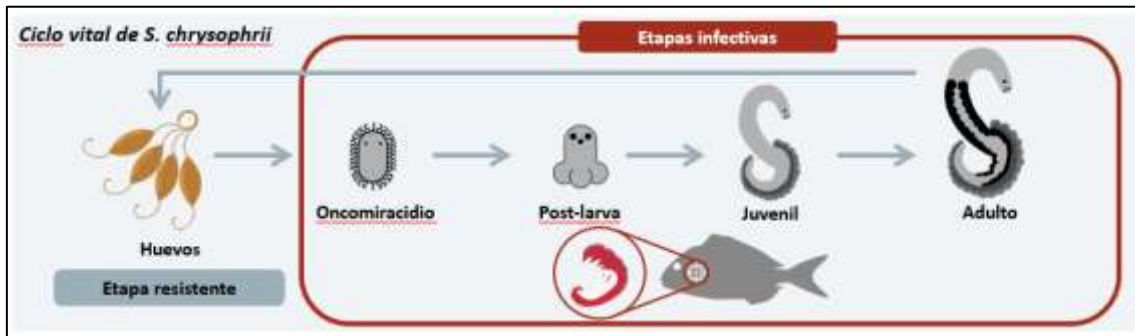


Figura 4. Ciclo vital de *Sparicotyle chrysophrii*. Crédito: E. Riera Ferrer.

Aunque *S. chrysophrii* se describió hace más de 150 años (van Beneden & Hesse, 1863), solo recientemente se han estudiado con más detalle algunos aspectos de su biología por parte de investigadores de la Universidad de Valencia y se ha obtenido información sobre el desarrollo *in vitro*, se han determinado la supervivencia y el comportamiento de natación de oncomiracidios y el desarrollo de postlarvas (Repullés et al., 2011, 2012; Villar-Torres et al., 2015).

Los detalles sobre la fisiología y las vías metabólicas y las interacciones específicas con el hospedador están en su mayoría sin explorar. Para ilustrar esta brecha, una búsqueda en WOS (Web of Science, todas las bases de datos) con la palabra "Sparicotyle" solo da 32 resultados. Por ello, la labor investigadora desarrollada durante este TFG va dirigida al estudio de la interacción entre la dorada y *S. chrysophrii*. En concreto, se estudia la respuesta inmunológica del pez frente al parásito.

1.3. Sistema inmunitario en peces

Los peces poseen un sistema inmunitario completo en el que se integran la inmunidad innata (natural) y la adaptativa (adquirida), y se desarrollan mecanismos de memoria y especificidad inmunológica. La importancia de las superficies mucosas en el desencadenamiento de respuestas antigénicas ha sido reconocida en este grupo de vertebrados primitivos, dado que en ellas ocurren las primeras interacciones entre patógenos y hospedador.

Los tejidos mucosos en peces se encuentran principalmente en branquias, piel y sistema digestivo, protegiendo al organismo del medio externo al ser las primeras barreras inmunológicas. Los peces teleósteos poseen un tejido linfoide disperso asociado a los tejidos mucosos y carecen de nódulos linfáticos como se encuentran en vertebrados superiores. Estos componentes linfoides son los responsables del reconocimiento de patógenos y de la activación de las respuestas inmunitarias innatas y adquiridas.

Se han observado respuestas específicas frente a retos parasitarios en peces teleósteos, y más concretamente en la dorada, por lo que en esta especie sabemos que se activan mecanismos de memoria capaces de generar protección inmunológica (Picard-Sánchez et al., 2019; 2020). Los principales tipos leucocitarios implicados en las respuestas mucosas de peces son linfocitos (células B y T), granulocitos y macrófagos (Salinas, 2015).

La principal función de las células B tras su activación, es la síntesis de anticuerpos, las inmunoglobulinas (Ig), que en su forma secretada constituyen el principal factor humoral de la inmunidad específica. Las Igs se unen específicamente al antígeno que estimuló previamente su producción, impidiendo su dispersión y penetración en los tejidos. Los peces teleósteos poseen tres isotipos diferentes de Igs: IgM, IgT e IgD. IgM es la predominante en el plasma y IgT está presente en plasma, aunque parece tener un papel predominante en los tejidos mucosos (Zhang et al., 2010). Al igual que en mamíferos, el papel de la IgD de peces no ha sido muy explorado.

Dado que se dan todos los componentes necesarios para la activación de mecanismos de la memoria inmunológica en la dorada, queda abierta la puerta al desarrollo de terapias de vacunación para proteger al animal frente a retos patogénicos.

Durante el mantenimiento de las infecciones experimentales de dorada con *S. chrysophrii*, el grupo de Patología del IATS había observado previamente que los supervivientes de lotes de peces infectados después de 4-5 meses presentan intensidades de infección bajas (1-2 gusanos por pez) y la infección parece hacerse crónica sin afectar seriamente al pez, ya que los

parámetros hematológicos se reestablecen. Además, estos peces después de un año acaban perdiendo la infección. Estas observaciones son el punto de partida para el planteamiento del presente estudio que pretende determinar si las doradas generan una respuesta inmunitaria protectora basada en anticuerpos, cómo responden los peces recuperados de la infección al volverse a exponer al parásito y determinar algunos de los tipos celulares que participan en la respuesta a nivel local en las branquias.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal es encontrar soluciones para mitigar el impacto de las infecciones por *Sparicotyle chrysophrii* en cultivos acuícolas, aumentando el conocimiento necesario sobre la interacción hospedador-parásito.

Los objetivos específicos son:

- Determinar si la respuesta inmunológica adquirida que desarrollan las doradas al exponerse durante un reto secundario al parásito *Sparicotyle chrysophrii* genera protección asociada a la presencia de anticuerpos circulantes: Inmunoglobulina M e Inmunoglobulina T.
- Estudiar el papel que juegan los efectores celulares (células B, células T y granulocitos acidófilos) en branquia, durante la respuesta inmunológica frente al parásito.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Peces y diseño experimental

Se analizaron mediante inmunoensayo enzimático de adsorción (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) sueros de doradas para detectar los títulos de inmunoglobulinas del isotipo M (IgM) totales y específicas, y totales del isotipo T (IgT).

Los sueros proceden de una experiencia de infección experimental de doradas con el ectoparásito branquial *Sparicotyle chrysophrii* realizada en el IATS durante 2021. La experiencia consistió en exponer al parásito por primera vez a un grupo de doradas naive (NAI; peso medio 550 g) y a un grupo de doradas supervivientes de una infección previa (reexpuestas, RE; peso medio 417 g). Los peces NAI y RE, marcados mediante chips (passive integrated transponders, Pit-tags) cohabitaron repartidos en 2 tanques a los que se añadieron 300 huevos de *S. chrysophrii*, respectivamente. Se obtuvieron y congelaron los sueros de las doradas a lo largo de tres muestreos consecutivos y se registró su intensidad de infección (Tabla 1). Las doradas se mantuvieron en tanques interiores de PVC, con suministro continuo de agua de mar, bajo condiciones naturales fotoperíodo. La temperatura media del agua fue de 15,1 °C durante el período experimental. En todos los casos, la sangre se obtuvo por punción de los vasos caudales tras una ligera anestesia mediante baño con aceite de clavo a 30 ppm (Sigma), centrifugado a 1500 ×g y el plasma obtenido se almacenó en alícuotas a -20°C.

Tabla 1. Diseño experimental mostrando los días de exposición al parásito en los que tuvieron lugar los muestreos (M0, M1 y M2), el número de peces que se sacrificó en cada uno de ellos para la toma de muestras de doradas naive (NAI) y reexpuestas (RE) a *S. chrysophrii* y la intensidad de infección (Int.Inf) media ± MEE (número de gusanos recontados en branquia).

Muestreos	NAI		RE	
	N	Int. Inf.	N	Int. Inf.
M0 (antes de empezar la exposición a <i>S. chrysophrii</i>)	5	0	4	0
M1 (a los 28 días de exposición)	10	26,8 ± 7,2	9	19,1 ± 2,7
M2 (a los 61 día de exposición)	10	31,7 ± 10,0	10	8,8 ± 1,5

En estos muestreos también se obtuvieron muestras de branquias y bazo fijadas en formol neutro tamponado al 4% que se procesaron para histología en parafina. Estos tejidos, junto con branquias fijadas en Bouin procedentes de otra infección experimental realizada en el IATS en 2020 se utilizaron para inmunomarcajes que permiten observar diferentes tipos celulares implicados en la respuesta inmunitaria.

Las branquias fijadas en Bouin pertenecen a doradas expuestas por efluente a *S. chrysophrii* y clasificadas según sus diferentes grados de intensidad de infección (Tabla 2).

Tabla 2. Selección de muestras de tejidos fijados en Bouin para el marcaje inmunohistoquímico.

INTENSIDAD DE INFECCIÓN	NÚMERO DE PARÁSITOS	NÚMERO DE EJEMPLARES DE DORADA
Alta	> 50 adultos de <i>S. chrysophrii</i> por lado branquial	n = 3
Media	26-50 adultos de <i>S. chrysophrii</i> por lado branquial	n = 3
Baja	1-25 adultos de <i>S. chrysophrii</i> por lado branquial	n = 3
Control	no expuestos al parásito	n = 3

3.2. Análisis de IgM total mediante ELISA en muestras de sueros

En placas de 96 pocillos (Nunc-maxisorp, fondo plano) se incubó cada suero por duplicado diluido a 1/3.000 en tampón de tapizado durante la noche a 4°C en cámara húmeda (50 µl/pocillo de suero). El tampón de tapizado se preparó con 20 ml de la solución A (5,3 g de Na₂CO₃ en 250 ml ddH₂O) + 42,5 ml de la solución B (4,2 g de NaHCO₃ en 250 ml ddH₂O), se ajustó el pH a 9,6 y se añadió 0,01% de timerosal (0,025 g). Los pocillos se lavaron tres veces con TTBS (Tween20 Tris buffered saline, solución salina tamponada con Tris) (TBS + 0,05% Tween-20) y una vez con TBS (Tris buffered saline) y se sacudió la placa contra un papel absorbente hasta eliminar todo el tampón de lavado. Luego se incubaron los pocillos con 200 µl de tampón de bloqueo que se preparó con leche desnatada al 5% en TBS, durante 1,5 h a 37°C.

La placa se lavó y secó como anteriormente y se añadieron 50 µl/pocillo de anticuerpo policlonal (Pab) de conejo anti-IgM de dorada (Palenzuela et al., 1996) diluido 1/40.000 en tampón del

anticuerpo (3% de leche en polvo desnatada en TTBS). Después de 1 hora de incubación en estufa a 37°C, se volvió a lavar y secar la placa y se agregaron 50 µl/pocillo de anticuerpo secundario cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (Cac * HRP; BioRad) diluido 1/1.000 en tampón del anticuerpo. A los 30 minutos se preparó el sustrato para la peroxidasa, TMB (3,3',5,5'Tetramethylbencidina y peróxido de hidrógeno, según instrucciones del fabricante; BioRad).

Después del último lavado y secado, se añadieron 100 µl de TMB a cada pocillo y se reveló la placa a temperatura ambiente en oscuridad con agitación suave durante 30 min. La reacción se detuvo añadiendo 50 µl/pocillo de H₂SO₄ 1 N y las placas se leyeron a λ 450 nm en un espectrofotómetro de placas (Tecan). Mediante el programa de manejo del lector de placas se seleccionó, el tipo de placa, (Thermofisher Scientific- Nunclon 96 Flat transparent), el tiempo de agitación (5 s), y la medida de absorbancia (longitud de onda 450 nm). Las densidades ópticas medias (DO) se obtuvieron a partir de los valores leídos en las dos réplicas.

En todas las placas se incluyeron controles apropiados (sin suero de dorada y sin Pab) y blancos, y el valor de este último se restó de las DOs medias.

Este protocolo se aplicó primero en los sueros del muestreo M0 con el tiempo de revelado con TMB mencionado de 30 minutos y se obtuvieron valores de DOs muy altas y próximas al umbral superior de detección del espectrofotómetro. Por ese motivo luego se repitió el ELISA con los sueros del M0 con un tiempo de revelado de 15 minutos, tiempo que también se aplicó para los sueros del muestreo M1 y M2, para que las condiciones fueran las mismas y así, por tanto, los resultados comparables.

El ajuste del tiempo se debió a que en el espectrofotómetro algunos valores de absorbancia llegaron a superar el umbral máximo de lectura. Al reducir el tiempo de revelado se obtuvo una menor señal.

3.3. Análisis de IgT total mediante ELISA en muestras de sueros

La IgT, es una inmunoglobulina en principio propia de los tejidos mucosos que se suele encontrar en circulación en menor cantidad que la IgM. Cada suero se probó por duplicado y en cada placa se incluyeron los controles negativos (sin suero, sin anti-IgT) y blancos.

Se necesitaron 96 pocillos para todos los sueros duplicados de los muestreos M0, M1, M2, por lo que se utilizaron 2 placas para incluir los controles y blancos (Tabla 3).

Tabla 3. Distribución de los sueros y controles en las placas multipocillo.

Primera placa	M0, M1 x 2 réplicas
	+ los controles y blanco
Segunda placa	M2 x 2 réplicas
	+ los controles y blanco

La microplaca de fondo plano (96 pocillos, Nunc-maxisorp) se incubó con 100 µl/pocillo de suero de cada dorada diluido 1/5 en PBS (tampón fosfato salino, pH 7,3) durante la noche a 4°C en cámara húmeda. Los pocillos se lavaron tres veces con agua destilada, la placa se sacudió sobre papel absorbente hasta eliminar los restos de agua y luego se incubó con 200 µl/ pocillo de tampón de bloqueo (1% BSA en PBS), durante 2 horas a 37°C. La placa se lavó y secó como anteriormente y se añadieron 50 µl/pocillo de Pab anti-IgT (Piazzon et al., 2016) diluido 1/1.000 en 1% BSA/PBS.

Después de 1 hora de incubación a 37°C, se volvió a lavar y secar la placa y se agregaron 100 µl/pocillo de anticuerpo secundario cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (Cac * HRP; BioRad), la incubación duró 1 hora a 37°C. A los 30 minutos se preparó el sustrato para la peroxidasa, TMB. Después del último lavado y secado, se añadieron 100 µl de TMB a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad con agitación suave durante 30 min. La reacción de revelado se detuvo con 50 µl/pocillo de H₂SO₄ 1 N y las placas se leyeron a λ 450 nm en el espectrofotómetro de placas.

Las DOs medias se obtuvieron a partir de los valores leídos en las dos réplicas y se les restó el valor del blanco. Se incluyeron controles apropiados en todos los ensayos. Para el programa de

lectura de placa se seleccionó, el tipo de placa (Thermofisher Scientific- Nunclon 96 Flat transparent), el tiempo de agitación (5 segundos), y la medida de absorbancia a longitud de onda 450 nm.

3.4. ELISA específico IgM anti-*S. chrysophrii* para sueros

Cada suero se probó por duplicado y cada placa incluyó los controles negativos (sin antígeno, sin suero, sin anti-IgM) y blanco.

Las placas se incubaron con 50 μ l/pocillo de antígeno (homogenizado de gusano) diluido a 15 μ g/ml de proteínas totales en tampón de tapizado durante la noche a 4°C en cámara húmeda.

Los pocillos se lavaron tres veces con TTBS y una vez con TBS, se sacudió el tampón de lavado sobre un papel absorbente, y luego se incubó con 200 μ l/pocillo de tampón de bloqueo, que se preparó con TBS y 5% de leche en polvo desnatada, durante 2 horas a 37°C.

La placa se lavó como anteriormente y se secó y se añadieron 50 μ l/pocillo de suero de dorada diluido 1/25 (en 3% leche/TTBS) y se incubó durante toda la noche a 4°C. Se volvió a lavar y secar la placa y se agregaron 50 μ l/pocillo de Pab anti-IgM 1/13.000 para luego incubarla durante 2 horas a 37°C.

Se repitió el mismo procedimiento de lavados y secado y se incubó durante 1 hora con 50 μ l/pocillo de anticuerpo cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa (Cac * HRP; BioRad). A los 30 minutos se preparó el sustrato para la peroxidasa, TMB. Después del último lavado y secado, se añadieron 100 μ l de TMB a cada pocillo y se incubaron las placas a temperatura ambiente en oscuridad con agitación suave durante 30 min.

La reacción se detuvo con 50 μ l/pocillo de H₂SO₄ 1 N y las placas se leyeron a λ 450 nm en el espectrofotómetro de placas. Las DOs medias se obtuvieron a partir de los valores leídos en dos réplicas y se les restó el valor del blanco.

Para el manejo del espectrofotómetro se seleccionó en el programa de control, el tipo de placa (Thermofisher Scientific- Nunclon 96 Flat transparent), el tiempo de agitación (5 segundos), y la medida de absorbancia a longitud de onda 450 nm.

3.5. Marcaje por inmunohistoquímica de células B (mediante Pab anti-IgM) y granulocitos acidófilos (mediante Mab anti-G7) en branquia

Se fijaron porciones de tejido branquial y del bazo de doradas sanas e infectadas (36 muestras incluyendo cada uno de los muestreos (Tabla 4), en formalina tamponada al 10 % y se incluyeron en parafina para el procesamiento histológico, siguiendo los procedimientos estándar del servicio de histología del IATS. Secciones de 5 μm de grosor de los tejidos se recogieron en portaobjetos para microscopía Super Frost plus (Menzel-Gläser) y se dejaron secar durante la noche.

Mediante el Pab de conejo anti-IgM de dorada se marcaron las células productoras de inmunoglobulina M, linfocitos B y células plasmáticas, y mediante el Mab de ratón anti-G7 (Sepulcre et al., 2002) de dorada se marcaron los granulocitos acidófilos, que tienen un papel muy importante en la respuesta inmunitaria innata de la dorada.

Tabla 4. Selección de muestras de tejidos fijados en formol para el marcaje inmunohistoquímico. Las muestras de doradas naive (NAI) y reexpuestos (RE) a *S. chrysoophrii* pertenecen a 3 muestreos (M0, M1 y M2).

M0		M1		M2	
M0 NAI, n=3	M0 RE, n=3	M1 NAI, n=3	M1 RE, n=3	M2 NAI, n=3	M2 RE, n=3

Las secciones de los tejidos se desparafinaron e hidrataron y la actividad endógena de la peroxidasa fue bloqueada por incubación en peróxido de hidrógeno y metanol (H_2O_2 : MetOH 9:1) durante 30 minutos. Después de enjuagar con TBS, las secciones se incubaron con suero normal preinmune de kits específicos de Vector para detección de anticuerpos de conejo y ratón (suero de cabra para el marcaje de IgM y suero de caballo para el marcaje de G7).

Se eliminó el suero mediante lavado con TBS. Los portaobjetos se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente en 1% de BSA en TBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Para marcar células B IgM+, el anticuerpo primario empleado fue el Pab de conejo anti-IgM de dorada, diluido 1/60.000. Para marcar granulocitos acidófilos G7+, el anticuerpo primario empleado fue el Mab de ratón anti-G7 de dorada diluido 1/100.

Después de lavar los tejidos con TTBS seguido de otro lavado con TBS, se incubó con los anticuerpos secundarios de los kits, cabra anti-conejo y caballo anti-ratón conjugados con

peroxidasa, respectivamente, en 1% BSA en TBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se preparó el complejo avidina-biotina (ABC) de los kits, 30 minutos antes de su aplicación. Se realizó otro lavado con TTBS y TBS. A continuación, se aplicó el complejo ABC la avidina—biotina, que, en combinación con la peroxidasa, produce un cambio de coloración en presencia del sustrato diaminobenzina (DAB; Sigma).

Se realizó el último lavado, con TTBS, TBS y durante este lavado se preparó el sustrato diluyendo una pastilla de DAB (Sigma) según las indicaciones del fabricante. Se aplicó el sustrato (DAB) durante 4 minutos, se paró la reacción con agua destilada, se cubrieron los cortes con hematoxilina de Gill al 25% filtrada, durante 1 minuto y posteriormente se sumergieron los cortes en agua del grifo corriente durante 5 minutos y 5 minutos más en agua destilada.

Para finalizar se deshidrataron los cortes y se montaron en medio de montaje DPX (resina acrílica con base de xileno). Se incluyeron controles negativos apropiados omitiendo los anticuerpos primarios y secundarios, y empleando suero de conejo preinmune o TBS como sustitución.

Este protocolo de inmunohistoquímica se probó primero en tejidos (Branquia y Bazo) fijados en formol de peces RE y NAI (Tabla 4), pero el marcaje con los anticuerpos primarios no dio resultados. A continuación, se repitió en branquias, fijadas en Bouin de peces NAI clasificados por su intensidad de infección (Tabla 2). Con estos últimos tejidos se realizaron los recuentos de células inmunorreactivas y el análisis de datos.

También se probaron los anticuerpos Mab anti-Zap70 y Pab anti-GATA3 para la inmunodetección de células T aplicando desenmascaramiento antigénico por calor y presión en olla exprés, siguiendo el protocolo descrito en (Piazzon et al., 2018), pero no se obtuvo el marcaje esperado.

3.6. Análisis cuantitativo al microscopio óptico de las poblaciones celulares marcadas

Todos los cortes procesados para inmunohistoquímica se observaron con un microscopio óptico Leitz Dialux-22 conectado a una cámara digital OLYMPUS DP-70. Se realizaron fotos de 10 campos a una magnificación x400 (ocular x10; objetivo x40) de cada pez para cada uno de los anticuerpos. Se registraron las células G7 e IgM inmunorreactivas para todos estos campos y se calcularon las medias.

3.7. Análisis estadístico de los datos

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el software SigmaPLOT (SPSS Inc.). Se comprobaron, la distribución normal y la varianza mediante los test de Shapiro-Wilks y de Levene. Las comparaciones entre dos grupos se realizaron mediante el estadístico t-Student y las comparaciones entre más de dos grupos se realizaron mediante un test ANOVA de una vía. Cuando los datos no pasaron el test de normalidad o varianza se aplicó un test Kruskal-Wallis por rangos seguido del método Dunn. Finalmente, se analizó la correlación entre las medias de los recuentos de células G7+ y la intensidad de infección (número de gusanos/pez) mediante el coeficiente de correlación de Spearman. Para todos los análisis se empleó un nivel de significación $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. ELISA anti-IgM total

En el primer muestreo, M0, antes de que los peces se expusieran a los huevos de parásito, los niveles totales de IgM en circulación fueron significativamente mayores en doradas NAI que en doradas RE. En el primer muestreo, M1, realizado pasado un mes de exposición al parásito, los dos grupos experimentaron un descenso de IgM total, siendo de nuevo mayor el contenido de IgM total en los peces NAI. En el último muestreo, M2, pasados dos meses de exposición al parásito, los niveles de IgM total aumentaron en ambos grupos, pero en este caso en particular la IgM detectada en los RE superó a la IgM de los NAI (Figura 5).

Entre los NAI de los 3 diferentes muestreos las diferencias en los valores medios de IgM fueron mayores de lo que cabría esperar por casualidad; hubo una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,001$). Se realizó un procedimiento de comparación múltiple por pares (método Student-Newman-Keuls), donde se obtuvo que entre los NAI del M0 y del M1 hubo un descenso significativo de los niveles de IgM tras el primer mes de exposición al parásito. Este descenso significativo de la IgM total se mantuvo también para los NAI del M2 respecto al M0, pero no existieron variaciones significativas entre los NAI del M2 y del M1.

Entre los RE de los 3 diferentes muestreos las diferencias en los valores medios de IgM también fueron mayores de lo que cabría esperar por casualidad; hubo una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,029$). Posteriormente, se ejecutó un procedimiento de comparación múltiple por pares (método Student-Newman-Keuls), donde se obtuvo que entre los RE del M0 y del M1 había un descenso significativo, no había diferencias entre los RE del M0 y M2, pero sí hubo un aumento significativo de la IgM total en los RE del M2 respecto al M1 (Figura 5).

Finalmente, se realizó un Student t-test donde se compararon los niveles de IgM de los NAI y los RE en cada uno de los muestreos. El resultado fue que la diferencia en los valores medios de los dos grupos no era lo suficientemente grande como para rechazar la posibilidad de que la diferencia se debiera a la variabilidad del muestreo aleatorio. No hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos, donde el p-valor en el M0 era de 0,217, en el M1 de 0,576, y en el M2, de 0,423 (Figura 5).

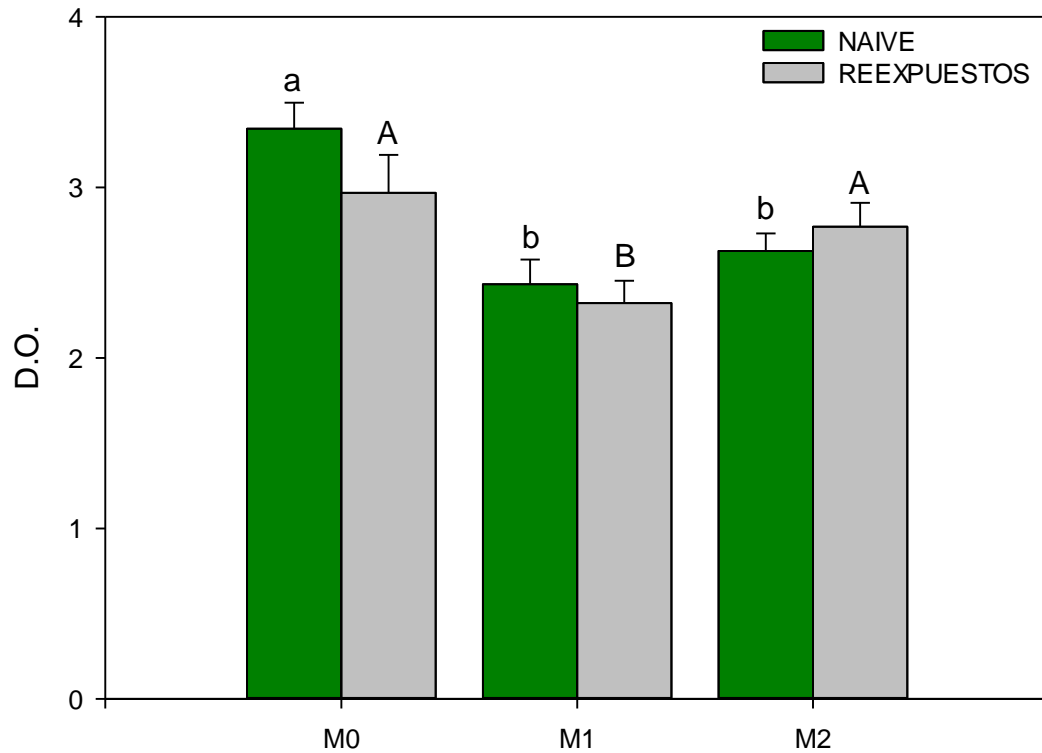


Figura 5. IgM total circulante mediante ELISA de doradas Naive y Reexpuestas después de la exposición a *Sparicotyle chrysophrii*. Diferentes letras minúsculas (NAIVE) o mayúsculas (REEXPUESTOS) indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) dentro de cada grupo experimental a lo largo de los muestreos (M0, M1 y M2). D.O. = Densidad óptica.

Se calcularon las diferencias entre los valores de las medias de IgM total medida en los sueros de los peces RE menos los NAI. La Figura 6 ilustra como al principio del periodo experimental (M0) los niveles de IgM total en NAI fueron los mayores y en el M1 siguieron manteniéndose por encima de los RE, aunque la diferencia fue menor. En el M2 por el contrario, los niveles de los peces RE superaron a los de los NAI.

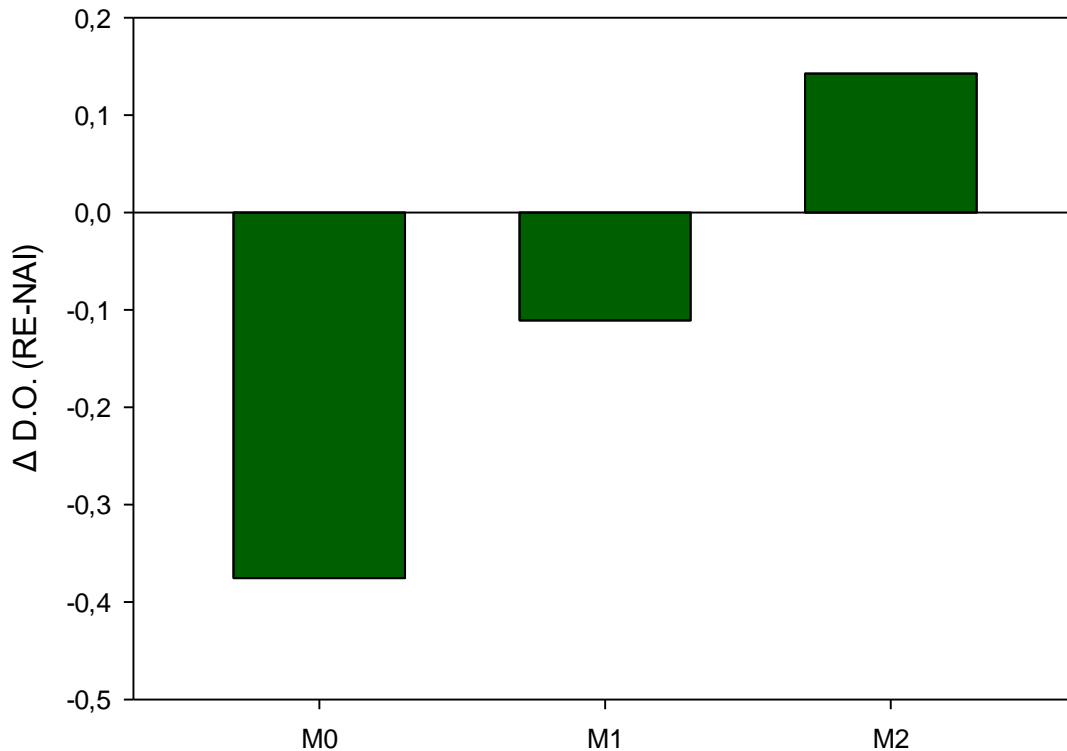


Figura 6. Diferencia de los valores medios de IgM total en circulación de doradas Naive (NAI) y Reexpuestas (RE) después de la exposición a *Sparicotyle chrysophrii* por ELISA, en los muestreos M0, M1 y M2. D.O. = Densidad óptica.

4.2. ELISA anti-IgT total

En M0, los niveles de IgT total en circulación en las doradas NAI fue mayor que la de los peces RE. En el M1, la IgT total de los dos grupos se mantuvo prácticamente igual que en el muestreo anterior. En el último muestreo, pasados dos meses de exposición al parásito, M2, la cantidad de IgT descendió bruscamente en ambos grupos, y la en los peces NAI seguía siendo superior que en los RE. La diferencia entre los dos grupos no fue significativa en ningún muestreo, aunque la diferencia entre grupos experimentales fue menor en M2 con respecto a los dos anteriores muestreos (Figuras 7 y 8).

Entre los NAI de los 3 diferentes muestreos las diferencias en los valores medios fueron mayores de lo que cabría esperar por casualidad; por lo tanto, hubo una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$).

Se realizó un procedimiento de comparación múltiple por pares (método Student-Newman-Keuls), donde se obtuvo que entre los NAI del M0 y del M2 hubo diferencias significativas, no las hubo entre los NAI del M0 y del M1, pero si existieron variaciones significativas entre los NAI del M1 y del M2 (Figura 7). Las letras minúsculas (a) representan donde no hay diferencias significativas entre niveles de IgT NAI, pero sin embargo en el M2, cambia de letra a la letra (b) para indicar una diferencia significativa respecto a los NAI de los otros muestreos (Figura 7).

Entre los RE de los 3 diferentes muestreos las diferencias en los valores medios también fueron mayores de lo que cabría esperar por casualidad y hubo una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$).

Posteriormente, se ejecutó un procedimiento de comparación múltiple por pares (método Student-Newman-Keuls), donde se obtuvo que entre los RE del M1 y del M2 hubo diferencias significativas, no las hubo entre los RE del M1 y el M0, pero existieron variaciones significativas entre los RE del M0 y del M2. Las letras mayúsculas (A) son iguales en los muestreos 0 y 1, donde no hay diferencias significativas, pero en el M2, sí hubo diferencias respecto a los muestreos 0 y 1, por tanto, cambia a (B).

Finalmente, se realizó un Student t-test donde se comparó la IgT NAI y la IgT RE de un mismo muestreo, en cada uno de los muestreos. El resultado fue que la diferencia en los valores medios de los dos grupos no fue lo suficientemente grande como para rechazar la posibilidad de que la diferencia se debiera a la variabilidad del muestreo aleatorio.

No hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos, donde el p-valor en el M0 fue de 0,629, en el M1 de 0,596, y en el M2 de 0,593.

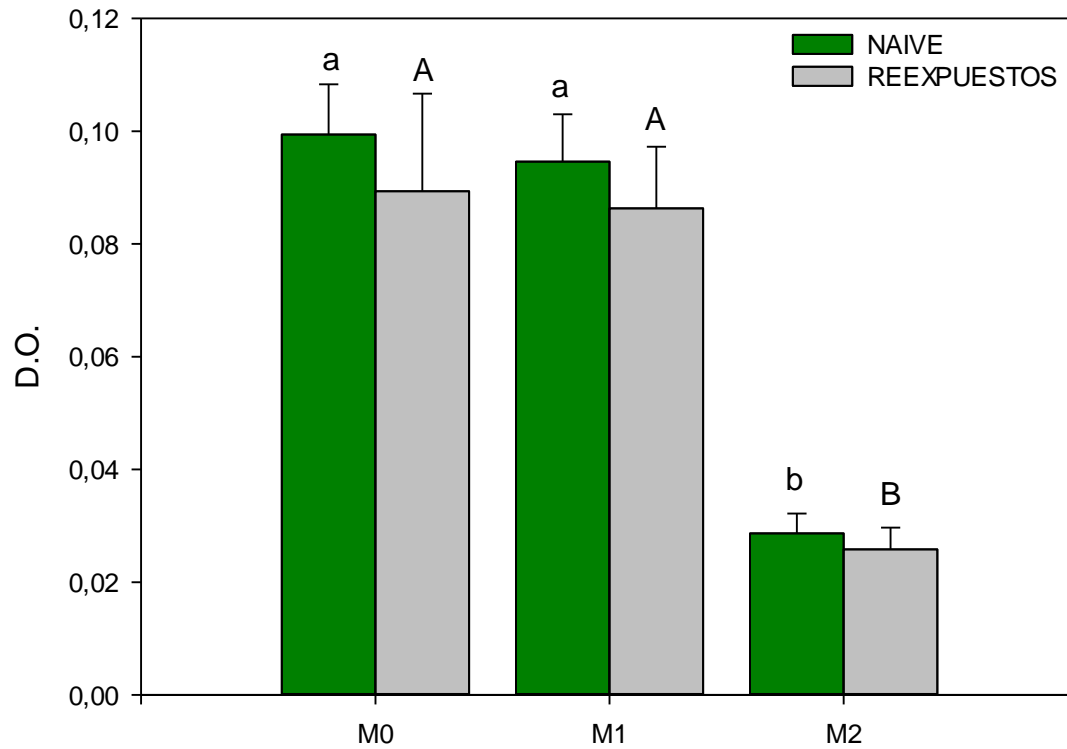


Figura 7. IgT total de doradas Naive y Reexpuestas después de la exposición a *Sparicotyle chrysophrii* medida por ELISA. Diferentes letras minúsculas (NAIVE) o mayúsculas (REEXPUESTOS) indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) dentro de cada grupo experimental a lo largo de los muestreos M0, M1 y M2. D.O. = Densidad óptica.

Se calcularon las diferencias entre los valores de las medias de IgT total medida en los sueros de los peces RE menos los NAI. La Figura 8 ilustra como esta diferencia es cada vez menor a lo largo de los sucesivos muestreos.

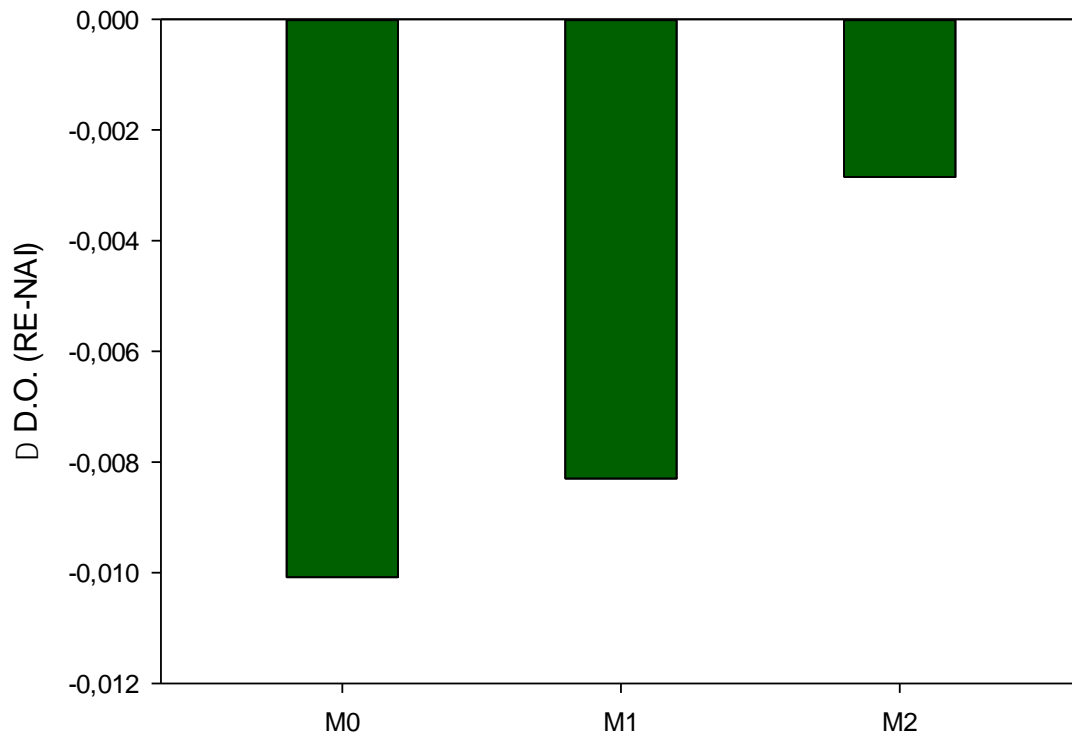


Figura 8. Diferencia de los valores medios de IgT total en suero de doradas Naive (NAI) y Reexpuestas (RE) después de la exposición a *Sparicotyle chrysophrii* por ELISA en los muestreos M0, M1 y M2. D.O. = Densidad óptica.

4.3. ELISA específico IgM anti-*S. chrysophrii*

En M0, la IgM específica de peces NAI fue significativamente mayor que la IgM específica de los RE en el momento inicial de la exposición a los huevos de parásito. En el M1, la IgM específica de NAI descendió con respecto al muestreo inicial y la IgM específica de RE aumentó en relación con el primer muestreo. En el último muestreo pasados dos meses de exposición al parásito, M2, el nivel de IgM específica aumentó en ambos grupos. La IgM específica de NAI se igualó prácticamente al M0 y la IgM específica de RE siguió aumentando respecto a los dos anteriores muestreos (Figura 9).

Entre los NAI de los 3 diferentes muestreos las diferencias en los valores medios no fueron lo suficientemente grandes como para excluir la posibilidad de que la diferencia se deba a la variabilidad del muestreo aleatorio; no hubo una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,607$).

Entre los RE de los 3 diferentes muestreos las diferencias en los valores medios fueron mayores de lo que cabría esperar por casualidad, por lo tanto, hubo una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,042$).

Posteriormente, se ejecutó un procedimiento de comparación múltiple por pares (método Student-Newman-Keuls), donde se obtuvo que entre los peces RE del M2 y del M0 hubo diferencias significativas, no las hubo entre los RE del M2 y el M1, y tampoco existieron variaciones significativas entre los RE del M1 y del M0. Las letras son minúsculas (a) en los muestreos 0 y 1, donde no hay diferencias significativas entre ellos, y entre el muestreo 1 y 2, tampoco hubo diferencias por tanto tienen la misma letra minúscula (b), el cambio de letra se debe a las variaciones entre el muestreo 0 y el 2 (Figura 9).

Finalmente, se realizó un Student t-test donde se comparó la IgM específica NAI y la RE de un mismo muestreo, en cada uno de los muestreos, y el resultado fue que la diferencia entre los valores medios de los dos grupos no era lo suficientemente grande como para rechazar la posibilidad de que la diferencia se debiera a la variabilidad del muestreo aleatorio. No hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales, donde el p-valor en el M0 era de 0,063, en el M1 de 0,307, y en el M2, de 0,093.

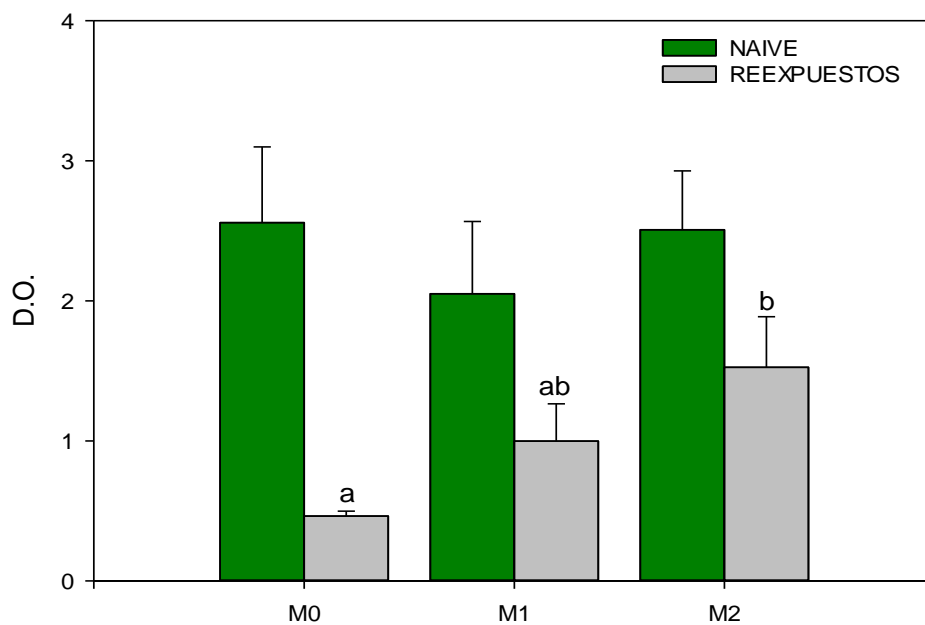


Figura 9. IgM específica en circulación de doradas Naive y Reexpuestas después de la exposición a *Sparicotyle chrysophrii* por ELISA. Diferentes letras minúsculas (REEXPUESTOS) indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) dentro del grupo experimental a lo largo de los muestreos M0, M1 y M2. D.O. = Densidad óptica.

Se calcularon las diferencias entre los valores de las medias de IgM específica anti-*S. chrysophrii* medida en los sueros de los peces RE menos los NAI. La Figura 10 ilustra como esta diferencia disminuye considerablemente después del M0 cuando los peces estuvieron expuestos al parásito.

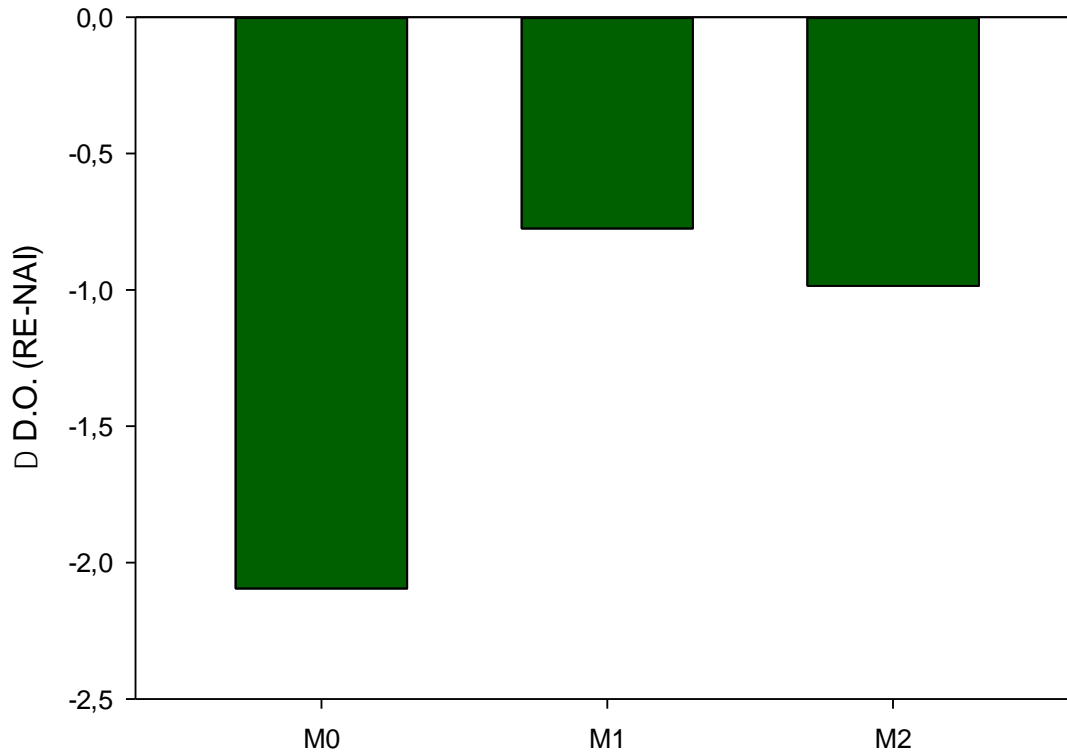


Figura 10. Diferencia de los valores medios de IgM específica anti-*Sparicotyle chrysophrii* en circulación de doradas Naive (NAI) y Reexpuestas (RE) después de la exposición al parásito por ELISA. D.O. = Densidad óptica.

4.4. Recuentos de células inmunorreactivas

Para los cortes de branquias en parafina, se seleccionaron peces con distintas intensidades de infección y los controles. Se recontaron las células inmunorreactivas IgM+ y G7+ en 10 campos diferentes del corte de tejido branquial, para cada uno de los peces y luego se calcularon las medias de las células marcadas vistas en estos 10 campos (Tabla 5).

Como se había mencionado anteriormente, en los tejidos (Branquia y Bazo) fijados en formol, no se obtuvo ningún resultado en el marcaje, esto se debe a que el fijador que se utilizó altera la estructura de las proteínas, impidiendo que se unan los anticuerpos.

Tabla 5. Medias de las células IgM+ y G7+ recontadas en los 10 campos observados al microscopio con una magnificación x400, en branquias de doradas control no expuestas (CTRL) y expuestas a *Sparicotyle chrysophrii*.

Grado de infección	Media de células IgM+	Media de células G7+
CTRL	0,1	0,5
CTRL	0,2	5
CTRL	0,2	0,5
BAJA	0	11,4
BAJA	0	2,9
BAJA	0	4,5
MEDIA	0	8,9
MEDIA	0,5	4,7
MEDIA	0	8,4
ALTA	0,4	8,1
ALTA	0,4	6,7
ALTA	0,1	10,3

En cuanto a la cuantificación de células IgM+, se encontraron muy pocas en general, y al no haber células inmunorreactivas en muchos campos, los valores de las medias del número de células recontadas son en todos los casos <1. Se observó que los peces control no expuestos mantenían valores medios de 0,18 aproximadamente, la infección baja ocupa valores tan ínfimos que no son representados en el gráfico, en cuanto a los peces de infección media los valores son cercanos a los del control y a con la infección alta la media de células supera el 0,3.

Las diferencias en los valores medios entre los grupos control, infección baja, media y alta, no fueron lo suficientemente grandes como para excluir la posibilidad de que la diferencia se deba a la variabilidad del muestreo aleatorio; no hubo una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,275$) (Figura 11). Se realizó otro ANOVA de una vía de estos datos sin tener en cuenta los controles, pero tampoco se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,245$).

En la comparación de las células IgM+ mediante t-test donde se enfrentó el grupo control con el receptor que incluyó todos los peces expuestos al parásito de las diferentes intensidades de infección, el resultado obtenido fue que la diferencia en los valores no era lo suficientemente grande como para excluir la posibilidad de que la diferencia se deba a la variabilidad del muestreo aleatorio; no hubo una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,500$) (Figura 12).

Se realizó también un t-test comparando los controles con la intensidad alta de infección, pero tampoco se obtuvieron diferencias significativas ($p = 0,313$).

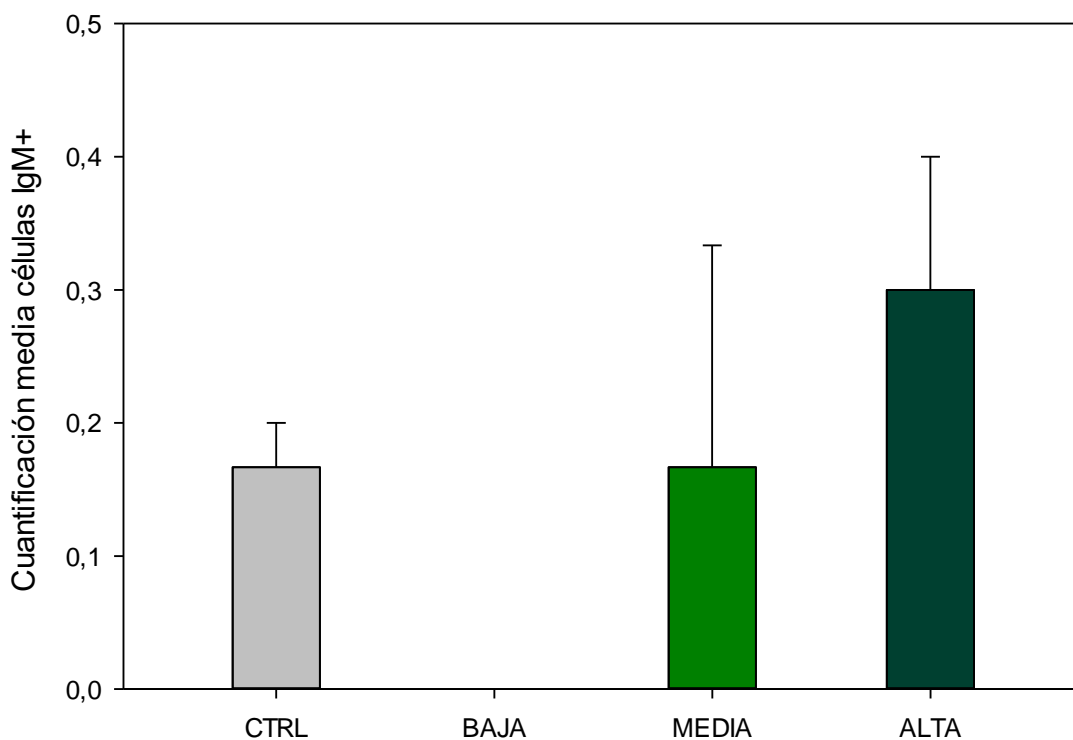


Figura 11. Cuantificación media de células IgM+ en branquia de dorada, según su intensidad de infección con *Sparicotyle chrysophrii*. CTRL = control no expuesto.

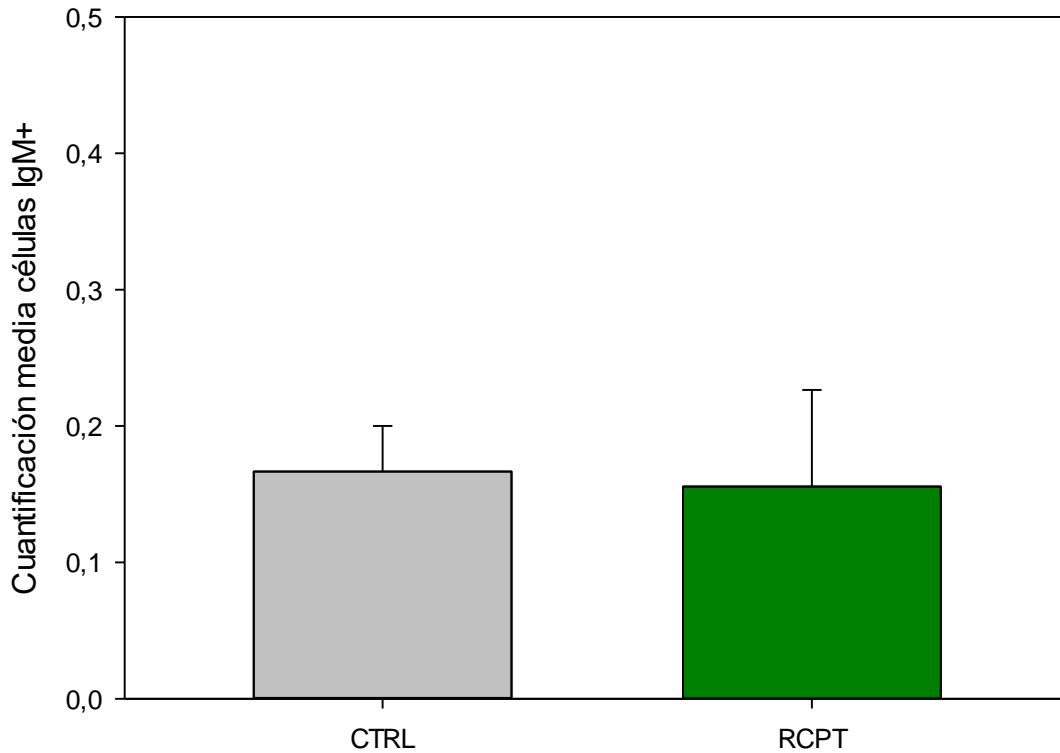


Figura 12. Cuantificación media de células IgM+ en branquia de dorada, según su estado de infección, diferenciando entre controles (CTRL) no expuestos y receptores (RCPT) expuestos a *Sparicotyle chrysophrii*.

Siguiendo con la cuantificación de células G7+, se observó que el control mantuvo valores medios cercanos a 2 aproximadamente, la infección baja superó valores medios de 6, en cuanto a la infección media los valores medios fueron cercanos a 7 y la infección alta se centró en valores medios alrededor de 9 células inmunorreactivas por campo. Las diferencias en los valores medios entre los grupos control, infección baja, media y alta, no fueron lo suficientemente grandes como para excluir la posibilidad de que la diferencia se deba a la variabilidad del muestreo aleatorio; no hubo una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,122$) (Figura 13). Se realizó otro ANOVA de una vía de las células G7+ sin incluir los controles, pero tampoco se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,723$). El test de correlación de Spearman detectó una correlación significativa positiva entre las medias de los recuentos de células G7+ y la intensidad de infección (número de gusanos/pez) de los peces ($p = 0,015$; Coef. Corr. = 0,67).

En la comparación del G7 mediante t-test donde se enfrentaron los peces controles con todos los demás peces infectados nombrados receptores, el resultado obtenido fue que la diferencia entre los valores medios de los dos grupos es mayor de lo que cabría esperar por casualidad;

hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los control y receptores ($p = 0,017$). La diferencia está marcada con un asterisco en el gráfico (Figura 14).

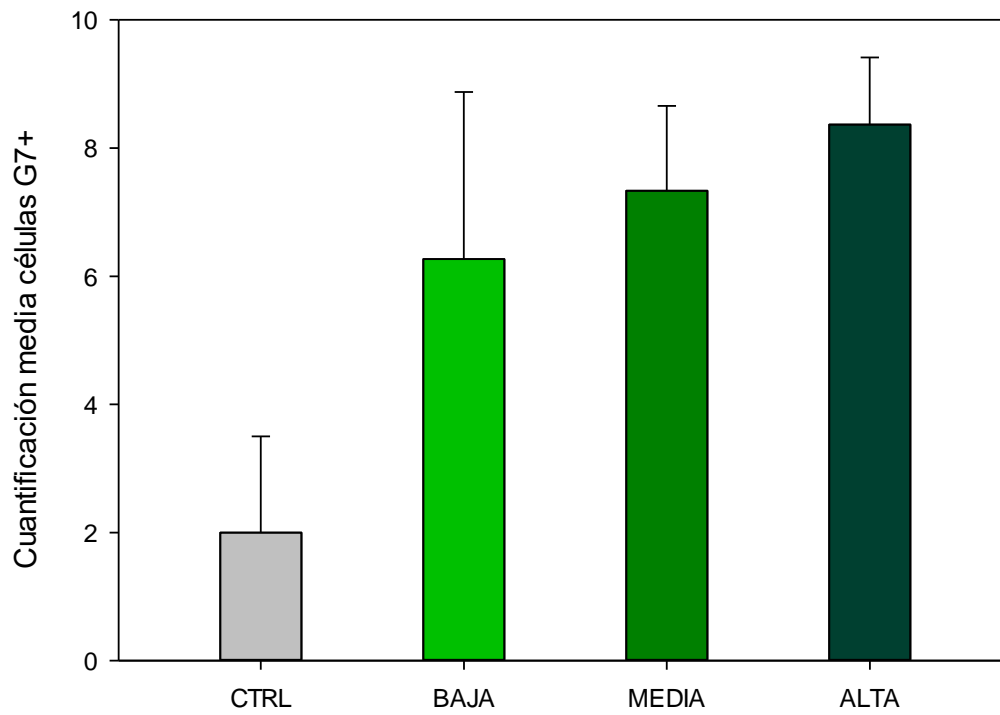


Figura 13. Cuantificación media de células G7+ en branquia de dorada, según su intensidad de infección.

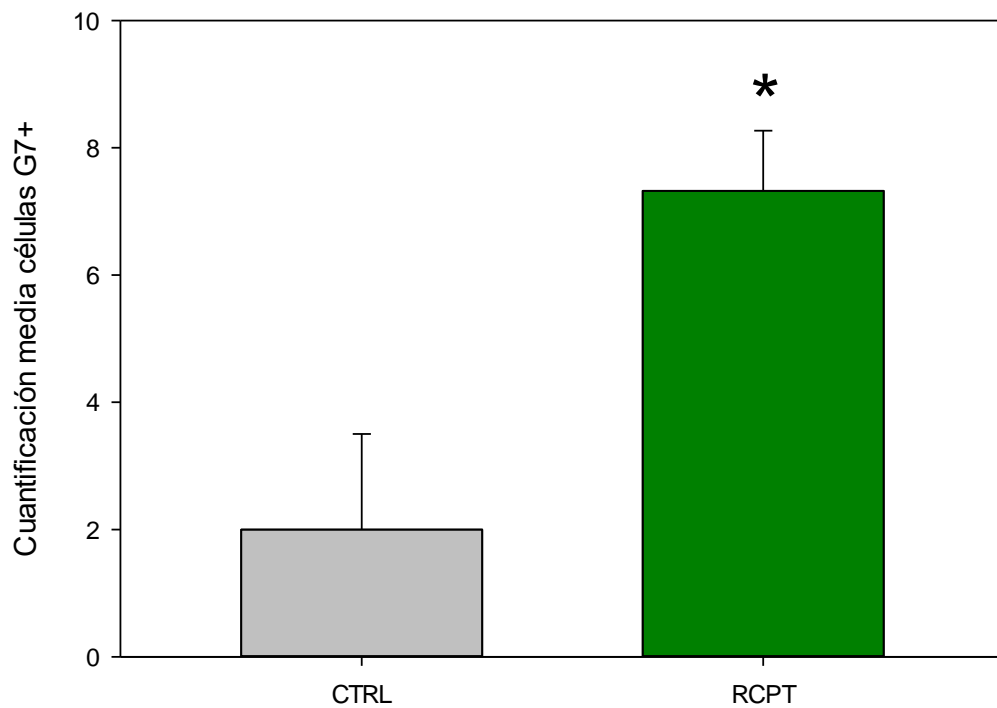


Figura 14. Cuantificación media de células G7+ en branquia de dorada, según su estado de infección, diferenciando entre controles (CTRL) y receptores (RCPT). El asterisco marca diferencias significativas entre los dos grupos (t-test, $p < 0.05$).

Ejemplos de las secciones y campos para el recuento celular de branquias marcadas por inmunohistoquímica y contrastadas con hematoxilina se muestran en la Figura 15. En la primera columna se han marcado los granulocitos acidófilos G7+ y en la columna de la derecha las células B IgM+. Dentro de las columnas se ordenan por intensidad de infección empezando por el control, baja, media y alta para el parásito *Sparicotyle chrysophrii*.

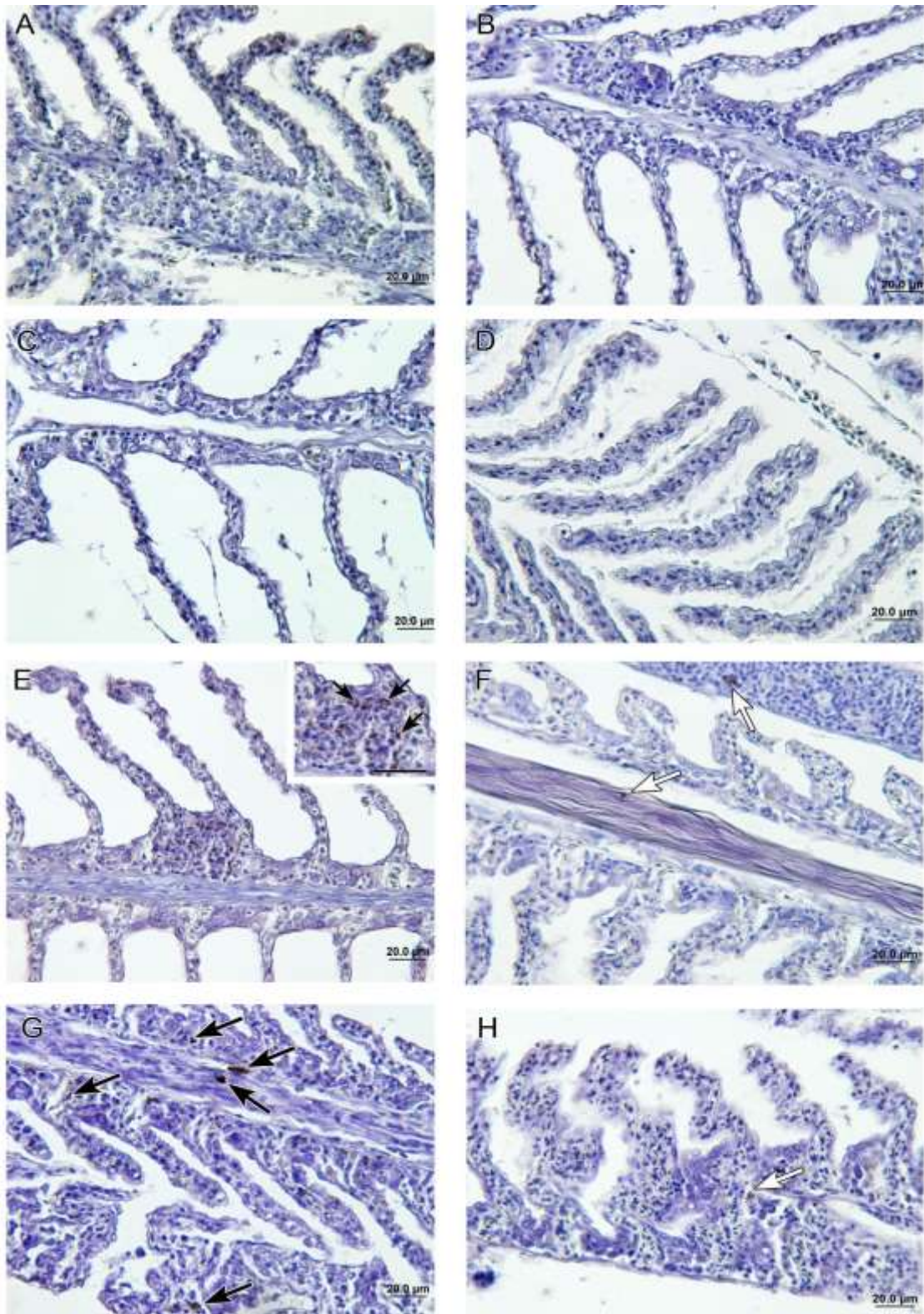


Figura 15. Granulocitos acidófilos G7+ (A, C, E, G) y células B IgM+ (B, D, F, H) en branquias de doradas control no expuestas al parásito (A, B), con intensidad de infección baja por *Sparicotyle chrysophrii* (C, D), intensidad media (E, F) e intensidad alta (G, H). Las flechas negras señalan granulocitos acidófilos y las flechas blancas células B. Todas las escalas = 20 µm.

Las localizaciones detalladas de las células inmunorreactivas observadas en las branquias se muestran en la Figura 16. Los granulocitos acidófilos se encontraron en las lamelas secundarias y vasos de los filamentos branquiales. Células B con aspecto de células plasmáticas por su gran citoplasma se encontraron a lo largo de los filamentos incluyendo en sus extremos distales. Cabe destacar, que cuando se encontraron especímenes de parásito en los cortes, no se observaron células inmunorreactivas junto a los puntos de anclaje del gusano ni junto a su región cefálica por dónde ingiere la sangre del hospedador.

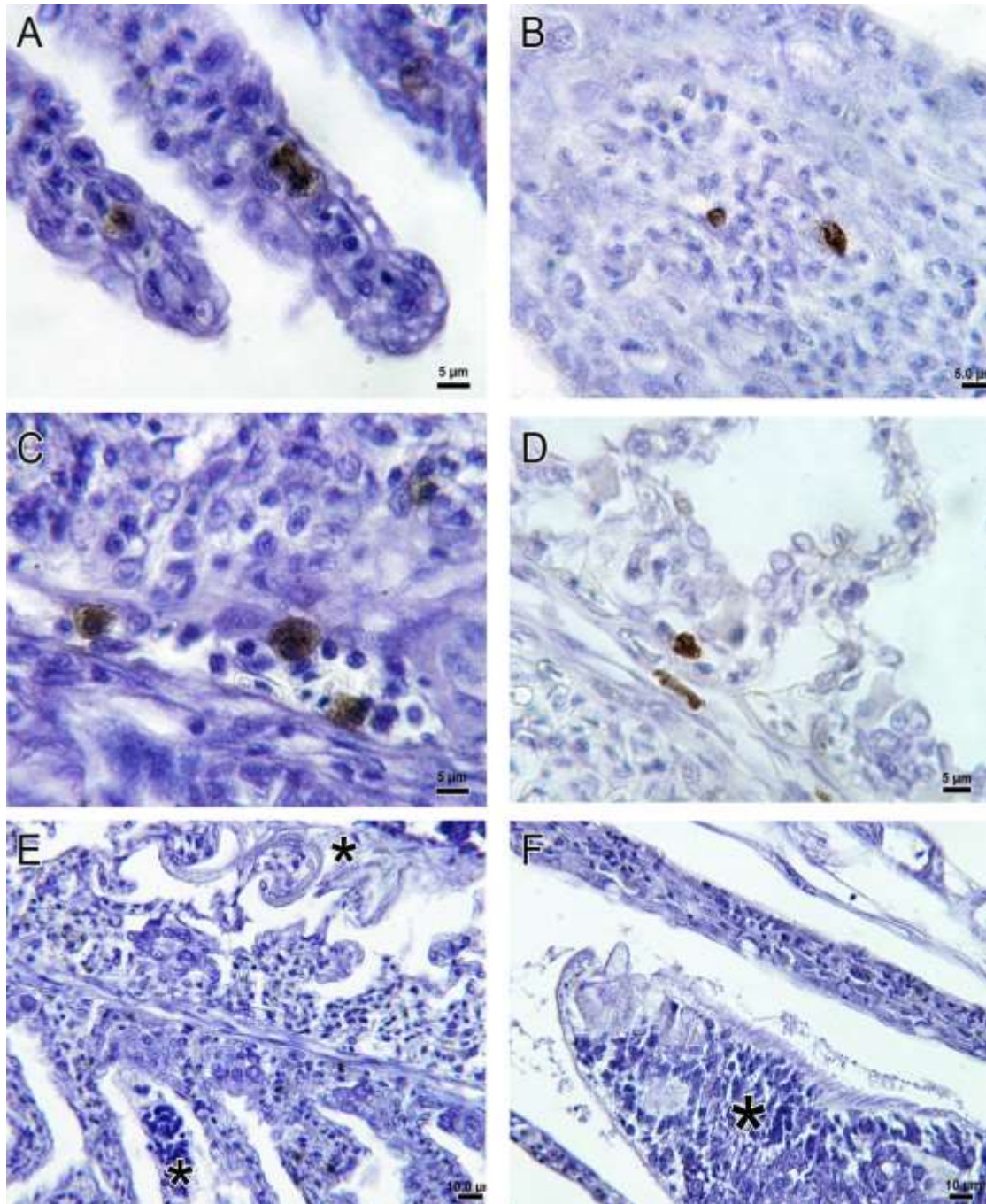


Figura 16. Detalles de los granulocitos acidófilos G7+ (A, C, E) y células B IgM+ (B, D, F) en branquias de doradas con alta intensidad de infección por *Sparicotyle chrysophrii*. Principalmente se observaron

células. G7+ en las lamelas secundarias (A) y vasos de los filamentos branquiales (C), y células IgM+ en los extremos distales (B) y a lo largo de los filamentos branquiales (D). En E y F los especímenes de *S. chrysophrii* se indican mediante asteriscos. Puede observarse la ausencia de células G7+ en la zona de anclaje del parásito (E) y de células IgM+ junto a la región cefálica del parásito (F).

Los primeros intentos de marcaje celular con tejidos de doradas NAI y RE no funcionaron debido a su fijación en formol neutro tamponado. El formaldehído del fijador produce puentes de metileno entre proteínas que pueden enmascarar los sitios de unión de los anticuerpos o epítopos. Por este motivo se seleccionaron como alternativa las branquias fijadas en Bouin, pertenecientes a doradas NAI clasificadas por su intensidad de infección. Por otro lado, no se consiguió el marcaje deseado de células T mediante anticuerpos heterólogos de mamífero, ya que no hubo reacción cruzada con el antígeno de la dorada. El uso de estos anticuerpos heterólogos, a pesar de estar validados para esta especie en otros tejidos (intestino), requieren una puesta a punto que ha superado el tiempo de este TFG. De todas formas, este ha sido el primer paso para la optimización requerida para este tejido en particular.

5. DISCUSIÓN

La esparicotylosis de la dorada está ampliamente distribuida por el Mediterráneo, y aunque este parásito no afecta a los humanos, tiene un grave impacto sobre la producción de la dorada en acuicultura. El hecho de que no existan métodos para prevenir o tratar esta enfermedad, hace que sea especialmente necesario entender cuáles son los mecanismos naturales que el pez desarrolla para protegerse frente al parásito. Este estudio ayudará a la búsqueda de soluciones para el control de la enfermedad.

En el presente estudio, los métodos aplicados de ELISA demostraron claramente que en la dorada ocurre una modulación de la producción de anticuerpos totales y específicos contra *Sparicotyle chrysophrii* y parece intervenir mayoritariamente el isotipo IgM a nivel sistémico.

El método de ELISA anti-IgM específica puesto a punto por primera vez en este TFG demostró ser un ensayo sensible y reproducible, que permitió el análisis de múltiples muestras para la detección de peces portadores de anticuerpos del isotipo IgM anti-*S. chrysophrii*.

En cuanto a los títulos de anticuerpos detectados en los grupos experimentales, observamos que en todos los casos los niveles de Igs en las doradas NAI fueron mayores que los de las RE, salvo para la IgM total en la que final del experimento se invierte esta situación. Para explicar esto debemos tener en cuenta el diseño experimental, en concreto el origen y edad de los peces utilizados. Las doradas RE fueron infectadas experimentalmente un año antes, se mantuvieron durante todo este periodo en las instalaciones del IATS hasta que se desparasitaron de manera natural y entonces tuvo lugar su segunda exposición al parásito en el presente experimento. En aquel momento, para realizar el estudio de la respuesta diferencial entre doradas supervivientes expuestas por segunda vez y doradas naive expuestas por primera vez al parásito, no se consiguieron animales del mismo origen y edad. Las doradas NAI empleadas fueron de mayor edad que las RE (peso medio NAI 550 g vs 417 g RE) y pertenecían a un lote de stock diferente. Atribuimos a esta diferencia los niveles basales mayores de Igs de las doradas NAI, y por ello se hace énfasis en comparar la respuesta dentro de cada grupo experimental a lo largo del experimento (dinámica de producción de anticuerpos), y no tanto los niveles puntuales entre ambos grupos.

Los resultados indicaron que la IgM total circulante disminuyó después del primer mes de exposición al parásito y luego aumentó durante el segundo en ambos grupos experimentales, pero sin llegar a superar el nivel inicial de IgM total que presentaba cada grupo. Esto nos demuestra que independientemente de si los peces se exponen por primera o segunda vez al

parásito, al comienzo de la infección hay un consumo o redistribución considerable de IgM que desaparece del sistema circulatorio y que con el avance de la infección se activa una respuesta inmunitaria humoral durante la cual se intentan reestablecer niveles mayores de IgM. Hay que destacar que en el grupo RE, se reestablecen los niveles iniciales de IgM total en M2, pero por el contrario en el grupo NAI aumenta solo levemente y no de manera significativa la IgM total, y no consigue restablecerse en el último muestreo (Figura 6). Por tanto, una segunda exposición al parásito en doradas recuperadas de la sparcitoylosis desencadena una respuesta humoral de una mayor intensidad y rapidez en cuanto a anticuerpos mayoritarios en circulación. Esta respuesta diferencial que muestran ambos grupos experimentales se ilustra en la Figura 7, en la que es evidente cómo en M2 se han invertido los niveles iniciales de IgM total respecto al M0. En el muestreo final el título de anticuerpos de los peces RE fue mayor que el de los NAI, a pesar de su diferente talla y edad.

En cuanto a los niveles de IgM específica anti-*S. chrysophrii* detectados en el suero, el grupo NAI posee valores altos y constantes que no varían a lo largo de los muestreos. Sin embargo, los niveles de IgM específica anti-*S. chrysophrii*, en el grupo RE, experimentan un aumento de manera gradual, que se vuelve significativo al final en el último muestreo. En estos peces, la segunda exposición a los antígenos inmunogénicos del parásito desencadena una respuesta específica, que implica la activación de la memoria inmunológica. En esta misma especie de pez se ha encontrado una respuesta sistémica similar frente a un parásito intestinal, donde los peces reexpuestos muestran un incremento gradual y más eficaz de IgM específica frente al parásito en suero (Picard-Sánchez et al., 2019).

Una respuesta inmunitaria temprana después de una nueva exposición es indicativa de una respuesta inmunitaria adquirida (respuesta anamnésica), en la que un antígeno específico activa su célula B contraespecífica en la diferenciación y expansión clonal para la producción temprana de Igs específicas (Burnet, 1976). En el estudio actual, la IgM específica anti-*S. chrysophrii*, en el grupo RE no se mantuvo elevada después de que estos peces fueran infectados por el parásito por primera vez, aunque no sabemos exactamente cuándo ocurrió la eliminación del parásito. La protección a largo plazo contra *S. chrysophrii* por parte de las células B podría ser factible, ya que estas células a largo plazo han sugerido respuestas celulares para algunas especies de teleósteos. Algunos estudios se han centrado en las respuestas secundarias de peces frente a organismos parásitos microscópicos. Por ejemplo, se encontraron anticuerpos específicos contra los flagelados patógenos *Amyloodinium ocellatum*, *Cryptobia salmositica*, *Trypanoplasma borreli* y *Trypanosoma carassii* después de la recuperación de brotes naturales y ensayos experimentales de exposición e inmunización en varias especies de teleósteos (Woo

& Ardelli, 2014). La trucha arcoíris reexpuesta después de 1 año al mixozoo *Tetracapsuloides bryosalmonae* respondió con aumentos significativos de las células B IgM+ circulantes y de la expresión de IgM secretada en el riñón posterior a los 10 días de reexposición, en comparación con los peces no expuestos y los naives expuestos (Bailey et al., 2017). Las carpas doradas que se recuperaron de la infección por *T. carassii* produjeron IgM protectora específica con alta actividad lítica *in vitro*, incluso antes de la reexposición (Katzenback et al., 2013). Las respuestas mediadas por anticuerpos que desarrollan los peces frente a macroparásitos platelmintos apenas han sido estudiadas y no hay constancia de que se hayan estudiado durante retos secundarios.

En este experimento, las doradas RE desarrollaron una respuesta protectora frente a *S. chrysophrii* que se reflejó en las intensidades de infección menores que las de los NAI. El presente estudio demostró que al menos en parte, la ventaja protectora de los RE frente a los NAI se debió al rápido desarrollo de una respuesta de IgM total y específica. Los bajos niveles de IgM específica en los RE del M0 implicarían la escasa presencia de células plasmáticas persistentes secretoras de anticuerpos específicos tras la recuperación de la enfermedad. Pero en estos peces, la exposición secundaria al parásito aparentemente desencadenó la selección clonal y la expansión de las células B que expresan IgM+ protectora con especificidad para los antígenos de *S. chrysophrii*.

En el salmón del Atlántico reexpuesto a *Kudoa thyrsites*, la respuesta inmune mediada por células por medio de macrófagos/células dendríticas, células T citotóxicas y células B resultó en una menor prevalencia de parásitos e intensidad de infección (Braden et al., 2018). Esas poblaciones de leucocitos probablemente también tengan un papel fundamental en la respuesta inmune adaptativa de los peces RE actuales, pero se necesitarán más estudios para descifrar su implicación.

Todos los peces RE, produjeron anticuerpos IgM específicos anti-*S. chrysophrii* y aunque se infectaron tras la reexposición, lo hicieron con una intensidad baja (4-36 gusanos/pez), probablemente porque fueron expuestos previamente al inmunógeno. Por el contrario, los peces NAI que al parecer partieron de niveles basales elevados de IgM específica se infectaron con intensidades mucho mayores (8-110 gusanos/pez).

La detección en dorada de anticuerpos IgM específicos anti-*S. chrysophrii* no se ha descrito antes. Henry et al. (2015) midieron la IgM total en circulación en doradas naive de 50 g control y doradas expuestas a *S. chrysophrii* durante 10 semanas y no encontraron diferencias. En cambio, Piazzon et al. (2019) detectaron un aumento significativo de la expresión de IgM y genes

relacionados en las branquias de doradas de 90 g tras una primera exposición a *S. chrysophrii*, en comparación con controles no expuestos.

Una alta proporción de los anticuerpos naturales no específicos está constituida por anticuerpos IgM y es la base de la inmunidad combinatoria/adquirida desde la evolución temprana de los vertebrados (Marchalonis et al., 2006). Se ha detectado una correlación entre los títulos de anticuerpos naturales y la capacidad de generar respuestas de anticuerpos primarias y secundarias protectoras y específicas para algunos salmónidos y ciprínidos (Sinyakov et al., 2002, Stromsheim et al., 1994). Si tales correlaciones influyen en la respuesta inmune humoral de la dorada, esto va más allá del alcance del presente estudio, pero merecería una investigación detallada. Sin embargo, los ensayos de vacunación realizados en dorada contra virus o bacterias han arrojado resultados contradictorios en cuanto a la protección adquirida asociada a los títulos de IgM (Joosten et al., 1995; Magariños et al., 1994; Valero et al., 2018).

La IgT mostró una tendencia decreciente a lo largo del tiempo, con una bajada especialmente significativa tras el segundo mes de exposición al parásito. Durante el primer mes, el desarrollo de *S. chrysophrii* llega de huevo a la fase de adulto al alcanzar la madurez sexual y cerrándose su ciclo vital. El descenso pronunciado de la IgT coincide con la presencia de parásitos adultos, lo que podría reflejar la intervención de la IgT preferentemente frente a este estadio o durante una fase más avanzada de la enfermedad. Es posible que la IgT sérica solo refleje un estado de transición durante el reclutamiento de células B IgT+ en su sitio de acción principal, el compartimento de la mucosa donde tiene lugar la infección, la branquia. La IgT se ha descrito como un isotipo de Ig específico de peces teleósteos, con una importante función en la mucosa similar a la IgA de los mamíferos (Zhang et al., 2010) y desempeña una función importante en la lucha contra otros parásitos de las mucosas, como *Ceratonova shasta* en el intestino (Zhang et al., 2010), y *Ichthyophthirius multifiliis* en branquias (Buchman 2020). Desafortunadamente, el anticuerpo IgT anti-dorada disponible no funciona en inmunohistoquímica, por lo que no pudimos cuantificar células IgT+.

Respecto a la respuesta celular que se observó en las branquias de los peces NAI, apenas se visualizó una respuesta de células B IgM+ tanto en peces controles como receptores. Éstas, que se encontraron solo en pocas ocasiones en los filamentos, fueron compatibles morfológicamente con células plasmáticas. Este resultado implicaría una escasa capacidad por parte del pez para presentar antígeno a células B y activarlas frente a cualquier agente infeccioso que ataque las branquias. Este resultado deberá ser confirmado mediante otras técnicas como la hibridación *in situ*.

Y en cuanto a los granulocitos acidófilos G7+, se encontraron en las lamelas secundarias y vasos de los filamentos branquiales. El número de células inmunorreactivas G7+ en branquia presenta una correlación positiva significativa con la intensidad de infección, visualizándose un aumento de células inmunorreactivas a mayor intensidad de infección (Figuras 14 y 16). Este resultado desvela la activación a nivel local de una respuesta celular innata frente a la infección en las doradas naive durante su primera exposición al parásito.

6. CONCLUSIONES

Tras los resultados obtenidos en el presente trabajo se ha observado que las doradas reexpuestas por segunda vez a *S. chrysophrii* tras haberse curado de la infección de manera natural, generan una respuesta inmune humoral adaptativa temprana y efectiva, que involucra un aumento mayor y más temprano de IgM en circulación, tanto total como específica contra el parásito, en comparación con las doradas expuestas al parásito por primera vez.

Se ha comprobado que durante un reto secundario con *S. chrysophrii* las doradas se infectan con menor intensidad y tiene lugar una respuesta específica basada en anticuerpos, por lo que terapias basadas en la vacunación mediante antígenos inmunogénicos o transferencia de anticuerpos específicos podrían ser potencialmente efectivas. Esto abre nuevas vías para el control de esta parasitosis. Además, se ha observado la existencia de una respuesta celular innata en las branquias durante la infección de la dorada con *S. chrysophrii*, que implica el reclutamiento de granulocitos acidófilos al órgano diana.

Los resultados actuales arrojan algo de luz sobre el conocimiento limitado de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas contra los parásitos monogéneos branquiales.

En conclusión, se han optimizado dos métodos para medir la respuesta humoral frente a *Sparicotyle chrysophrii* en doradas expuestas al parásito. Esto también abre la posibilidad de buscar posibles peces resistentes y estrategias profilácticas.

7. LÍNEAS FUTURAS

- Detección de anticuerpos en mucus branquial
 - Determinar si hay una respuesta más intensa a nivel local donde ocurre la infección que a nivel sistémico, es decir en circulación.
 - Comprobar si la disminución de IgT en circulación coincide con aumento en el órgano donde se produce la infección, en este caso concreto la branquia.
- Seguimiento a largo plazo, por ejemplo 1 año, de los títulos de IgM e IgT durante la cronificación y desparasitación natural de las doradas
 - Seguimiento de la cinética de los títulos de Igs durante el proceso de generación de protección para establecer el tiempo necesario para la generación de memoria inmunológica.
 - Se podría complementar con el estudio de poblaciones celulares en órganos para determinar la cinética de las células B y T en branquia (mediante hibridación *in situ*) y melanomacrófagos en bazo (observación directa al microscopio).
- Selección de sueros con mayor título de anticuerpos para marcaje de parásitos mediante inmunohistoquímica
 - Determinar cuáles son los estadios y las estructuras del parásito antigénicas.
 - Este sería un primer paso para buscar dianas antigénicas para el desarrollo de vacunas.
- Selección de sueros con mayor título de anticuerpos específicos para prueba de inmunización pasiva
 - Comprobar si se genera protección frente al parásito cuando las doradas reciben inyección de suero de animales inmunizados.

8. BIBLIOGRAFÍA Y WEBGRAFÍA

- Antonio, D. B., & Hedrick, R. P. (1995). Effect of water temperature on infections with the microsporidian *Enterocytozoon salmonis* in chinook salmon. *Diseases of Aquatic Organisms*, 22(3). <https://doi.org/10.3354/dao022233>
- Bailey, C., Segner, H., & Wahli, T. (2017). What goes around comes around: an investigation of resistance to proliferative kidney disease in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) following experimental re-exposure. *Journal of Fish Diseases*, 40(11). <https://doi.org/10.1111/jfd.12628>
- Braden, L. M., Rasmussen, K. J., Purcell, S. L., Ellis, L., Mahony, A., Cho, S., Whyte, S. K., Jones, S. R. M., & Fast, M. D. (2018). Acquired protective immunity in Atlantic salmon *Salmo salar* against the myxozoan *Kudoa thyrsites* involves induction of MHI β + CD83+ antigen-presenting cells. *Infection and Immunity*, 86(1). <https://doi.org/10.1128/IAI.00556-17>
- Burnet F. M. (1976) A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *CA Cancer J Clin*. 26:119–121.
- Costello, M. J. (2006). Ecology of sea lice parasitic on farmed and wild fish. In *Trends in Parasitology* (Vol. 22, Issue 10). <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.08.006>
- Estensoro, I., Álvarez-Pellitero, P., & Sitjà-Bobadilla, A. (2013). Antigenic characterization of *enteromyxum leei* (Myxozoa: Myxosporae). *Diseases of Aquatic Organisms*, 106(2). <https://doi.org/10.3354/dao02651>
- Estensoro, I., Caldach-Giner, J. A., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., & Sitjà-Bobadilla, A. (2012). Modulation of the IgM gene expression and IgM immunoreactive cell distribution by the nutritional background in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) challenged with *Enteromyxum leei* (Myxozoa). *Fish and Shellfish Immunology*, 33(2). <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.05.029>
- Estensoro, I., Mulero, I., Redondo, M. J., Álvarez-Pellitero, P., Mulero, V., & Sitjà-Bobadilla, A. (2014). Modulation of leukocytic populations of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) by the intestinal parasite *Enteromyxum leei* (Myxozoa: Myxosporae). *Parasitology*, 141(3). <https://doi.org/10.1017/S0031182013001789>

- Estensoro, I., Redondo, M. J., Álvarez-Pellitero, P., & Sitjà-Bobadilla, A. (2014). Immunohistochemical characterization of polyclonal antibodies against *Enteromyxum leei* and *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa: Myxosporidia), intestinal parasites of fish. *Journal of Fish Diseases*, 37(9). <https://doi.org/10.1111/jfd.12168>
- FAO. FAO yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2016. Rome (2018). pp.104
- Fioravanti, M. L., Caffara, M., Florio, D., Gustinelli, A., & Marcer, F. (2006). A parasitological survey of European sea bass (*Dicentrarchus Labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus Aurata*) cultured in Italy. *Veterinary Research Communications*, 30(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1007/s11259-006-0053-5>
- Henry, M. A., Nikoloudaki, C., Tsigenopoulos, C., & Rigos, G. (2015). Strong effect of long-term *Sparicotyle chrysophrii* infection on the cellular and innate immune responses of gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Developmental and Comparative Immunology*, 51(1). <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.03.010>
- Iwanowicz, D. D. (2011). Overview On The Effects Of Parasites On Fish Health. *Proceedings of the Third Bilateral Conference between Russia and the United States. Bridging America and Russia with Shared Perspectives on Aquatic Animal Health*
- Karvonen, A., Rintamäki, P., Jokela, J., & Valtonen, E. T. (2010). Increasing water temperature and disease risks in aquatic systems: Climate change increases the risk of some, but not all, diseases. *International Journal for Parasitology*, 40(13). <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.04.015>
- Katzenback, B. A., Plouffe, D. A., & Belosevic, M. (2013). Goldfish (*Carassius auratus* L.) possess natural antibodies with trypanocidal activity towards *Trypanosoma carassii* in vitro. *Fish and Shellfish Immunology*, 34(5). <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.12.018>
- Marchalonis, J. J., Adelman, M. K., Schluter, S. F., & Ramsland, P. A. (2006). The antibody repertoire in evolution: Chance, selection, and continuity. *Developmental and Comparative Immunology*, 30(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.dci.2005.06.011>
- Meyer, F. P. (1991). Aquaculture disease and health management. In *Journal of animal science* (Vol. 69, Issue 10). <https://doi.org/10.2527/1991.69104201x>
- Monir, M. S., Bagum, N., Rahman, S., Ashaf-Ud-Doulah, M., Bhadra, A., & Chakra Borty, S. (2015). Parasitic diseases and estimation of loss due to infestation of parasites in Indian major carp culture ponds in Bangladesh. ~ 118 ~ *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 2(5).

- Olsen, M. M., Kania, P. W., Heinecke, R. D., Skjoedt, K., Rasmussen, K. J., & Buchmann, K. (2011). Cellular and humoral factors involved in the response of rainbow trout gills to Ichthyophthirius multifiliis infections: Molecular and immunohistochemical studies. *Fish and Shellfish Immunology*, 30(3). <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.01.010>
- Okamura, B., Gruhl, A., & Bartholomew, J. L. (2015). An introduction to myxozoan evolution, ecology and development. In *Myxozoan Evolution, Ecology and Development*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-14753-6_1
- Palenzuela, O., Sitjà-Bobadilla, A., & Álvarez-Pellitero, P. (1996). Isolation and partial characterization of serum immunoglobulins from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 6(2). <https://doi.org/10.1006/fsim.1996.0010>
- Papapanagiotou, E. P., & Trilles, J. P. (2001). Cymothoid parasite *Ceratothoa parallela* inflicts great losses on cultured gilthead sea bream *Sparus aurata* in Greece. *Diseases of Aquatic Organisms*, 45(3). <https://doi.org/10.3354/dao04523>
- PAPERNA, I. (1980). Amyloodinium ocellatum (Brown, 1931) (Dinoflagellida) infestations in cultured marine fish at Eilat, Red Sea: epizootiology and pathology. *Journal of Fish Diseases*, 3(5). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1980.tb00421.x>
- Piazzon, M. C., Estensoro, I., Calduch-Giner, J. A., del Pozo, R., Picard-Sánchez, A., Pérez-Sánchez, J., & Sitjà-Bobadilla, A. (2018). Hints on T cell responses in a fish-parasite model: *Enteromyxum leei* induces differential expression of T cell signature molecules depending on the organ and the infection status. *Parasites and Vectors*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3007-1>
- Piazzon, M. C., Galindo-Villegas, J., Pereiro, P., Estensoro, I., Calduch-Giner, J. A., Gómez-Casado, E., Novoa, B., Mulero, V., Sitjà-Bobadilla, A., & Pérez-Sánchez, J. (2016). Differential modulation of IgT and IgM upon parasitic, bacterial, viral, and dietary challenges in a perciform fish. *Frontiers in Immunology*, 7(DEC). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00637>
- Piazzon, M. C., Mladineo, I., Naya-Català, F., Dirks, R. P., Jong-Raadsen, S., Vrbatović, A., Hrabar, J., Pérez-Sánchez, J., & Sitjà-Bobadilla, A. (2019). Acting locally - Affecting globally: RNA sequencing of gilthead sea bream with a mild *Sparicotyle chrysophrii* infection reveals effects on apoptosis, immune and hypoxia related genes. *BMC Genomics*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5581-9>

- Picard-Sánchez, A., Estensoro, I., del Pozo, R., Piazzon, M. C., Palenzuela, O., & Sitjà-Bobadilla, A. (2019). Acquired protective immune response in a fish-myxozoan model encompasses specific antibodies and inflammation resolution. *Fish and Shellfish Immunology*, 90. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.04.300>
- Quiroga, M. I., Redondo, M. J., Sitjà-Bobadilla, A., Palenzuela, O., Riaza, A., Macías, A., Vázquez, S., Perez, A., Nieto, J. M., & Alvarez-Pellitero, P. (2006). Risk factors associated with *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) infection in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Parasitology*, 133(4). <https://doi.org/10.1017/S0031182006000515>
- Rigos, G., & Katharios, P. (2010). Pathological obstacles of newly-introduced fish species in Mediterranean mariculture: A review. In *Reviews in Fish Biology and Fisheries* (Vol. 20, Issue 1). <https://doi.org/10.1007/s11160-009-9120-7>
- Rintamäki-Kinnunen, P., Bernardet, J. F., & Bloigu, A. (1997). Yellow pigmented filamentous bacteria connected with farmed salmonid fish mortality. *Aquaculture*, 149(1–2). [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01431-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01431-7)
- Salinas, I. (2015). The mucosal immune system of teleost fish. In *Biology* (Vol. 4, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/biology4030525>
- Sepulcre, M., Pelegrín, P., Mulero, V., & Meseguer, J. (2002). Characterisation of gilthead seabream acidophilic granulocytes by a monoclonal antibody unequivocally points to their involvement in fish phagocytic response. *Cell and Tissue Research*, 308(1). <https://doi.org/10.1007/s00441-002-0531-1>
- Shinn, A. P., Pratoomyot, J., Bron, J. E., Paladini, G., Brooker, E. E., & Brooker, A. J. (2015). Economic costs of protistan and metazoan parasites to global mariculture. In *Parasitology* (Vol. 142, Issue 1). <https://doi.org/10.1017/S0031182014001437>
- Sindermann, C. J. (1987). Effects of parasites on fish populations: Practical considerations. *International Journal for Parasitology*, 17(2). [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(87\)90112-3](https://doi.org/10.1016/0020-7519(87)90112-3)
- Sinyakov, M. S., Dror, M., Zhevelev, H. M., Margel, S., & Avtalion, R. R. (2002). Natural antibodies and their significance in active immunization and protection against a defined pathogen in fish. *Vaccine*, 20(31–32). [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00379-1](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00379-1)

- Sitjà-Bobadilla, A., & Alvarez-Pellitero, P. (1995). Light and electron microscopic description of *Polysporoplasma* n. g. (Myxosporea: Bivalvulida), *polysporoplasma sparis* n. sp. from *Sparus aurata* (L), and *Polysporoplasma mugilis* n. sp. from *Liza aurata* L. *European Journal of Protistology*, 31(1). [https://doi.org/10.1016/S0932-4739\(11\)80360-3](https://doi.org/10.1016/S0932-4739(11)80360-3)
- Stentiford, G. D., Sritunyalucksana, K., Flegel, T. W., Williams, B. A. P., Withyachumnarnkul, B., Itsathitphaisarn, O., & Bass, D. (2017). New Paradigms to Help Solve the Global Aquaculture Disease Crisis. *PLoS Pathogens*, 13(2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006160>
- Subasinghe, R., Soto, D., & Jia, J. (2009). Global aquaculture and its role in sustainable development. *Reviews in Aquaculture*, 1(1). <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01002.x>
- Tavares-Dias, M., & Martins, M. L. (2017). An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. In *Journal of Parasitic Diseases* (Vol. 41, Issue 4). <https://doi.org/10.1007/s12639-017-0938-y>
- Woo, P. T. K., & Ardelli, B. F. (2014). Immunity against selected piscine flagellates. In *Developmental and Comparative Immunology* (Vol. 43, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.07.006>
- Yanagida, T., Sameshima, M., Nasu, H., Yokoyama, H., & Ogawa, K. (2006). Temperature effects on the development of *Enteromyxum* spp. (Myxozoa) in experimentally infected tiger puffer *Takifugu rubripes* (Temminck & Schlegel). *Journal of Fish Diseases*, 29(9). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2006.00752.x>
- 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. *Nature Immunology*, 11(9). <https://doi.org/10.1038/ni.1913>