



Facultad de Veterinaria

Trabajo de  
Fin de Grado

Caracterización morfológica  
e inmunohistoquímica de  
adyuvantes vacunales  
en rodaballo  
(*Scophthalmus maximus*)

Beatriz Ordóñez Gómez

**Grado en Veterinaria**

Año 2025

Modalidad del Trabajo: Experimental

# Licencia

Excepto donde se haga constar explícitamente, esta obra pertenece a Beatriz Ordóñez Gómez y está bajo una licencia de “Creative Commons Reconocimiento 4.0 Internacional”.



## **RESUMEN**

Las vacunas son herramientas esenciales para la prevención de enfermedades infecciosas, ya que actúan sobre el sistema inmune adaptativo y generan memoria inmunológica frente a patógenos específicos. En acuicultura, su uso es clave, existiendo múltiples vacunas. Todas ellas incluyen un componente fundamental, el adyuvante, que desempeña un papel esencial como inmunoestimulador; sin embargo, hay riesgo de reacciones secundarias.

Con el presente trabajo, se estudió la respuesta inmunitaria temprana en rodaballo (*Scophthalmus maximus*) tras la administración intraperitoneal de dos vacunas experimentales diferenciadas por el tipo de adyuvante, uno en base gel (“Xe1”) y otro en base aceite (“763”). Se establecieron tres tiempos de muestreo (días 4, 7 y 14 post-vacunación), realizándose la necropsia y toma de muestras de los órganos abdominales (bazo, páncreas, hígado y sistema digestivo) y riñón para su análisis histopatológico. Se aplicaron técnicas de tinción histológica (Hematoxilina-Eosina) e inmunohistoquímica, utilizando marcadores específicos de respuesta humoral adaptativa temprana (inmunoglobulina M – IgM), de proliferación celular (antígeno nuclear de células proliferantes – PCNA) y de apoptosis celular (caspasa-3 activa – C3A).

Macroscópicamente, en ambos grupos se observó material blanquecino firme sobre los órganos abdominales. Histológicamente, ambos adyuvantes indujeron una peritonitis granulomatosa difusa grave, caracterizada por un infiltrado inflamatorio de macrófagos y células epitelioides, en torno a depósitos de una sustancia amorfa eosinofílica (adyuvante en base gel), o a gotas ópticamente vacías (adyuvante en base aceite). La reacción inflamatoria fue más intensa y precoz con el adyuvante en base aceite, mientras que el adyuvante en base gel mostró una progresión gradual, alcanzando similar gravedad al día 14.

La inmunohistoquímica reveló abundante positividad para IgM y PCNA en la periferia de los granulomas en ambos grupos, aunque con diferencias temporales. El adyuvante en base gel mostró además alta expresión de C3A<sup>+</sup> en las células próximas al centro de las lesiones, asociada a necrosis tisular, lo que sugiere mayor actividad apoptótica. En contraste, el adyuvante en base aceite presentó baja positividad para C3A.

Los resultados evidencian que el tipo de adyuvante influye directamente en la intensidad y evolución de la respuesta inmunitaria. Además, se destaca la importancia de combinar el examen macroscópico, histológico e inmunohistoquímico para una caracterización completa de las reacciones vacunales, ya que manifestaciones aparentemente similares macroscópicamente pueden diferir significativamente a nivel tisular e inmunológico.

**Palabras Clave:** Rodaballo, adyuvante, reacción inflamatoria, IgM, PCNA, Caspasa-3 activa.

## RESUMO

As vacinas son ferramentas esenciais para a prevención de enfermidades infecciosas, xa que actúan sobre o sistema inmunitario adaptativo e xeran memoria inmunolóxica fronte a patóxenos específicos. Na acuicultura, o seu uso é clave, existindo múltiples vacinas. Todas elas inclúen un compoñente fundamental: o adxuvante, que desempeña un papel esencial como inmunoestimulador; con todo, existe o risco de reaccións secundarias.

Co presente traballo, estudouse a resposta inmunitaria temperá no rodaballo (*Scophthalmus maximus*) tras a administración intraperitoneal de dúas vacinas experimentais diferenciadas polo tipo de adxuvante, unha con base xel (“Xel”) e outra con base aceite (“763”). Establecéronse tres tempos de mostraxe (días 4, 7 e 14 post-vacunación), realizándose a necropsia e a toma de mostras dos órganos abdominais (bazo, páncreas, fígado e sistema dixestivo) e ril para a súa análise histopatolóxica. Aplicáronse técnicas de tinción histolóxica (Hematoxilina-Eosina) e inmunohistoquímica, empregando marcadores específicos de resposta humoral adaptativa temperá (inmunoglobulina M – IgM), de proliferación celular (antíxeno nuclear de células proliferantes – PCNA) e de apoptose celular (caspase-3 activa – C3A).

Macroscópicamente, en ambos grupos observouse material blanquecino e firme sobre os órganos abdominais. Histoloxicamente, ambos adxuvantes induciron unha peritonite granulomatosa difusa grave, caracterizada por un infiltrado inflamatorio de macrófagos e células epitelioides ao redor de depósitos dunha substancia amorfa eosinofílica (adxuvante en base xel) ou de pingas ópticamente baleiras (adxuvante en base aceite). A reacción inflamatoria foi máis intensa e precoz co adxuvante en base aceite, mentres que o adxuvante en base xel mostrou unha progresión gradual, acadando gravidade semellante ao día 14.

A inmunohistoquímica revelou abundante positividade para IgM e PCNA na periferia dos granulomas en ambos grupos, aínda que con diferenzas temporais. O adxuvante en base xel mostrou ademais unha alta expresión de C3A<sup>+</sup> nas células próximas ao centro das lesións, asociada á necrose tisular, o que suxire maior actividade apoptótica. En contraste, o adxuvante en base aceite presentou baixa positividade para C3A.

Os resultados evidencian que o tipo de adxuvante inflúe directamente na intensidade e evolución da resposta inmunitaria. Ademais, débese destacar a importancia de combinar o exame macroscópico, histolóxico e inmunohistoquímico para unha caracterización completa das reaccións vacinais, xa que manifestacións aparentemente semellantes a nivel macroscópico poden diferir significativamente a nivel tisular e inmunolóxico.

**Palabras chave:** Rodaballo, adxuvante, reacción inflamatoria, IgM, PCNA, Caspasa-3 activa.

**ABSTRACT**

Vaccines are essential tools for the prevention of infectious diseases, as they act on the adaptive immune system and generate immunological memory against specific pathogens. In aquaculture, their use is crucial, with a wide range of vaccines available. All of them include a key component: the adjuvant, which plays an essential role as an immunostimulant; however, it carries a risk of secondary reactions.

In the present study, the early immune response in turbot (*Scophthalmus maximus*) was evaluated following intraperitoneal administration of two experimental vaccines differentiated by the type of adjuvant: one gel-based (“XeI”) and the other oil-based (“763”). Three sampling times were established (days 4, 7, and 14 post-vaccination), during which necropsies were performed and samples were taken from abdominal organs (spleen, pancreas, liver, and digestive system) and kidney for histopathological analysis. Histological staining techniques (Hematoxylin-Eosin) and immunohistochemistry were applied, using specific markers for early adaptive humoral response (Immunoglobulin M – IgM), cell proliferation (Proliferating Cell Nuclear Antigen – PCNA), and cell apoptosis (Active Caspase-3 – C3A).

Macroscopically, whitish firm material was observed over abdominal organs in both groups. Histologically, both adjuvants induced severe diffuse granulomatous peritonitis, characterized by an inflammatory infiltrate of macrophages and epithelioid cells surrounding either amorphous eosinophilic material (gel-based adjuvant) or optically empty droplets (oil-based adjuvant). The inflammatory reaction was more intense and occurred earlier with the oil-based adjuvant, whereas the gel-based adjuvant showed a more gradual progression, reaching similar severity by day 14.

Immunohistochemistry revealed abundant IgM<sup>+</sup> and PCNA<sup>+</sup> cells in the periphery of granulomas in both groups, although with temporal differences. The gel-based adjuvant also showed strong expression of C3A<sup>+</sup> in cells near the lesion centers, associated with tissue necrosis, suggesting higher apoptotic activity. In contrast, the oil-based adjuvant showed low C3A positivity.

These findings demonstrate that the type of adjuvant directly influences the intensity and progression of the immune response. Moreover, the study highlights the importance of combining macroscopic, histological, and immunohistochemical analyses for a comprehensive characterization of vaccine-induced reactions, as apparently similar macroscopic findings may differ significantly at the tissue and immune levels.

**Keywords:** Turbot, adjuvant, inflammatory response, IgM, PCNA, active caspase-3.

## **ÍNDICE**

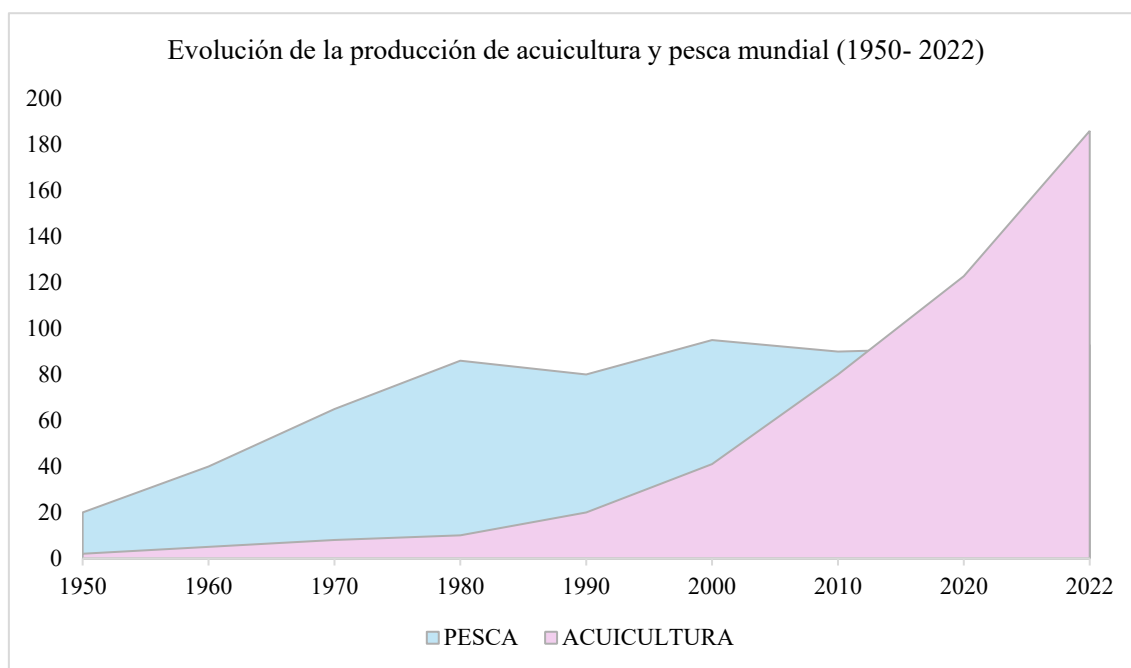
1.- Introducción.....	6
1.1.- La acuicultura; situación actual.....	6
1.1.1.- Principales problemas patológicos en la acuicultura.....	7
1.2.- La vacunación en la acuicultura.....	9
1.2.1.- Sistema inmunitario de los peces.....	11
1.2.2.- Técnicas histológicas para la evaluación de la respuesta vacunal.....	13
2.- Objetivos.....	16
3.- Materiales y Métodos.....	17
3.1.- Toma de muestras.....	17
3.2.- Procesado de las muestras para el estudio histológico.....	18
3.3.- Tinción con Hematoxilina-Eosina.....	19
3.4.- Inmunohistoquímica.....	19
4.-Resultados.....	23
4.1.- Estudio macroscópico.....	23
4.2.- Estudio histopatológico.....	23
4.2.1.- Adyuvante en base gel (“Xel”).....	23
4.2.2.- Adyuvante en base aceite (“763”).....	24
4.3.- Estudio inmunohistoquímico.....	26
4.3.1.-Caracterización de células IgM <sup>+</sup> .....	26
4.3.2.-Caracterización de células PCNA <sup>+</sup> .....	28
4.3.3.-Caracterización de células Caspasa-3 activa <sup>+</sup> .....	30
5.- Discusión.....	33
5.1.- Estudio macroscópico e histopatológico.....	34
5.2.- Estudio inmunohistoquímico.....	36
5.2.1.-Caracterización de IgM.....	36
5.2.2.-Caracterización de PCNA.....	37
5.2.3.-Caracterización Caspasa-3 activa .....	38
6.- Conclusiones.....	39
7.- Bibliografía.....	40

## 1.- INTRODUCCIÓN

### 1.1.- LA ACUICULTURA; SITUACIÓN ACTUAL

En respuesta a la saturación por la creciente demanda a nivel mundial de productos pesqueros, la acuicultura surge como una alternativa sostenible para suplir esa falta, contribuyendo, además a la seguridad alimentaria y al progreso socioeconómico, especialmente en países en desarrollo (FAO, 2009).

A partir de mediados del siglo pasado, la producción total de animales acuáticos ha sufrido un incremento medio anual del 3'2% (a partir del 2020 el incremento fue del 6'6%), pasando de 2 millones de toneladas en 1950 a 130 millones de toneladas en 2022 y superando por primera vez a la pesca extractiva, situando a la acuicultura como una actividad clave para alimentación de la creciente población mundial (APROMAR, 2024; FAO, 2024) (*Gráfica 1*).



*Gráfica 1.* Evolución de la producción de acuicultura y pesca mundial (1950- 2022). Adaptado de APROMAR, 2024; FAO, 2024.

La producción acuícola varía según factores tanto intrínsecos como extrínsecos de cada región; sin embargo, a nivel mundial, los peces, tanto de agua dulce como marina, representan la mayor proporción en términos de toneladas producidas. En cuanto a los peces marinos, las especies más destacadas son el salmón del Atlántico (*Salmo salar*), la dorada (*Sparus aurata*), la corvina japonesa (*Larimichthys croceus*) y la lubina (*Dicentrarchus labrax*) (FAO, 2024).

España es el país de la Unión Europea con mayor producción, destacando por su volumen y la diversidad de especies cultivadas. Hoy en día se cultivan en torno a 40 especies de peces y

mariscos a lo largo de todo el territorio nacional, abarcando desde bivalvos como los mejillones (*Mytilus spp.*) o las ostras (*Crassostrea gigas*) salmónidos como la trucha (*Onchorynchus mykiss*), peces planos como el lenguado (*Solea senegalensis*) y el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) u otros como la lubina o la dorada (APROMAR, 2024; MAPA, 2023).

Si se analiza la producción por comunidades autónomas, Galicia ocupa el tercer lugar, con una producción que cada año va en aumento, especialmente gracias al cultivo del rodaballo (APROMAR, 2024). Las características geográficas del litoral gallego, marcado por sus rías, junto con una temperatura óptima y bajos niveles de contaminación, conforman un entorno único para el desarrollo de la acuicultura. Estos factores son clave para garantizar una buena producción, ya sea desde el punto de vista, económico o higiénico-sanitario (Fraga-Corral et al., 2021).

El sector acuícola gallego es uno de los más importantes de España, y ha sufrido grandes cambios en las últimas décadas, impulsados especialmente por el incremento en el número de instalaciones dedicadas a la acuicultura que se han construido a lo largo de sus costas (Garza-Gil et al., 2017).

Las piscifactorías y viveros son empresas con instalaciones en tierra, que en Galicia destacan por la cría y engorde de peces planos (Surís-Regueiro y Santiago, 2014). Entre las especies más importantes se encuentran el rodaballo y el lenguado, ambos con un gran valor comercial debido a la aceptación entre los consumidores por sus características organolépticas (carne blanca, sabor suave y bajo porcentaje de grasa) (Fraga-Corral et al., 2021).

La producción de rodaballo en Galicia se inició a principios de los años 80 para, en los últimos 45 años consolidarse y convertirse actualmente en el principal productor europeo y, en la única comunidad autónoma productora de esta especie en España (APROMAR 2024; Fernández-González et al., 2020).

### **1.1.1.- Principales problemas patológicos en la acuicultura.**

El rendimiento de cualquier sistema de producción animal intensivo depende en gran medida de la salud de sus animales; así pues, la acuicultura no es una excepción. En este contexto, poco a poco, el sector ha aumentado su interés y estudio en genética, nutrición, enfermedades infecciosas, prevención... (Garza-Gil et al., 2017). Estas ramas son fundamentales para mantener un hábitat con condiciones óptimas y adecuadas para garantizar la supervivencia de los animales, evitar el desarrollo de enfermedades (víricas, bacterianas, parasitarias, nutricionales...) y consecuentemente, mejorar el rendimiento productivo y bienestar, y disminuir la pérdida de ejemplares (Moreira et al., 2021).



Así mismo, la producción acuícola presenta una particularidad, el hábitat natural de los peces es el agua, un entorno que actúa como vehículo y medio de cultivo ideal para el de crecimiento de múltiples patógenos (Raja y Jithendran, 2015).

Actualmente, el control de las enfermedades infecto-contagiosas (ya sean de origen vírico, bacteriano, parasitario o fúngico) es uno de los grandes desafíos a los que se enfrenta la industria acuícola, por lo que la investigación es esencial a la hora de comprender tanto la enfermedad como su patogenia y la afectación de los organismos y poder así desarrollar recursos para su prevención, control y tratamiento (Garza-Gil et al., 2017; Moreira et al., 2021; Raja y Jithendran, 2015).

Entre los principales agentes bacterianos destaca *Photobacterium damsella* subsp. *piscicida*, aislada inicialmente en ejemplares juveniles de sargo común (*Diplodus sargus*). Causa la fotobacteriosis y se caracteriza por la presencia de nódulos blanquecinos en el bazo, que histológicamente se corresponden histológicamente con granulomas (Costa et al., 2017; Santos et al., 2022; Zhou et al., 2025). Ocasionalmente puede participar en infecciones mixtas con diversas especies del género *Vibrio* (*V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. fischeri*) (Rigos y Katharios, 2009), responsables de brotes de vibriosis en múltiples especies de peces de acuicultura (Torrecillas et al., 2017; Torres-Corral et al., 2021), como la dorada, el dentón común (*Dentex dentex*), el sargo, el besugo blanco (*Pagellus acarne*) o el lenguado (Rathor y Swain, 2024; Rigos y Katharios, 2009). Desde un punto de vista patológico, la enfermedad cursa con cuadros septicémicos y lesiones dérmicas crónicas, como úlceras y hemorragias (Torrecillas et al., 2017).

Otro patógeno a destacar es *Tenacibaculum maritimum*, es el agente causal de una enfermedad ulcerativa y con alta tasa de mortalidad, conocida como tenacibaculosis (Faílde et al., 2013; Mabrok et al., 2023) y que afecta a peces como el lenguado, el rodaballo o salmónidos (Faílde et al., 2013; Rigos y Katharios, 2009). Por su parte, los microorganismos pertenecientes al género *Flavobacterium* causan una patología similar a la tenacibaculosis, pero suele afectar a juveniles de especies de agua dulce, y en especial a los salmones y truchas (Zamora et al., 2013).

La forunculosis, producida por *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida*, en el caso del rodaballo, presenta forma aguda o crónica. La forma aguda está caracterizada por una septicemia hemorrágica inespecífica y la crónica cursa con nódulos cutáneos en la cara ocular, que en ocasiones se ulceran, y que, histológicamente, se corresponden con áreas de dermatitis granulomatosas (Coscelli et al., 2014; Fajardo et al., 2023; Torres-Corral et al., 2022).

Finalmente, es de gran importancia patológica *Philasterides dicentrarchi*, un parásito ciliado que provoca una parasitemia sistémica. En el cultivo del rodaballo es culpable de grandes pérdidas,

pues su mortalidad es muy elevada, con lo que el desarrollo de vacunas para hacerle frente es un nicho de investigación muy importante (Iglesias et al., 2001; Piazzon et al., 2011).

## **1.2.- LA VACUNACIÓN EN LA ACUICULTURA**

Históricamente, las enfermedades bacterianas se han afrontado mediante el uso de antimicrobianos, principalmente antibióticos. Sin embargo, el uso indiscriminado de estos fármacos ha llevado a un rápido aumento de cepas resistentes, lo que supone un gran riesgo de seguridad alimentaria, salud pública y un problema que causa pérdidas millonarias en el sector (Hamed et al., 2021; John et al., 2023; Rathor y Swain, 2024; Torres-Corral et al., 2021).

Así pues, en la búsqueda y desarrollo de nuevas estrategias de manejo, la vacunación es una herramienta clave para la prevención y control de múltiples patologías en las granjas piscícolas de producción en todo el mundo (Hamed et al., 2021; John et al., 2023; Torres-Corral et al., 2021).

La vacunación de peces se remonta al año 1942, en el cual se trabajaba en el desarrollo de una vacuna frente a *Aeromonas salmonicida* en la trucha (Duff, 1942). Desde ese año y hasta la primera década de los 2000, la vacunación en acuicultura ha sufrido una expansión a nivel mundial (Adams, 2016; Elumalai et al., 2023; Makesh y Rajendran, 2022; Tammam et al., 2024a). Hoy en día, se comercializan más de 50 vacunas destinadas a más de 30 especies de peces (Rathor y Swain, 2024).

Las vacunas como finalidad inducir la activación del sistema inmunitario adaptativo en peces, mediante la presentación controlada de un antígeno que provoca una respuesta inmunitaria específica y memoria inmunológica (Adams, 2016; Elumalai et al., 2023; Makesh y Rajendran, 2022; Tammam et al., 2024a). Además de su función como mecanismo de defensa, aumentan el rendimiento productivo y contribuyen al desarrollo sostenible de la industria acuícola. (Alfatat et al., 2025; Hamed et al., 2021; Mkulo et al., 2024; Makesh y Rajendran, 2022; Mondal y Thomas, 2022; Tammam et al., 2024a).

Actualmente, existen en el mercado cuatro tipos principales de vacunas, vacunas inactivadas, vacunas vivas atenuadas, vacunas de subunidades y vacunas basadas en ADN; que cubren un centenar de enfermedades bacterianas, parasitarias y víricas, causadas por múltiples agentes etiológicos como *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida*, *Tenacibaculum maritimum*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Edwardsiella ictaluri*, *Streptococcus agalctiae*, virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV Rhabdovirus), virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV Orthomyxovirus), virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV Birnavirus)...Además, pueden administrarse de diversas

formas, como por inmersión directa, vía oral o por inyección, siendo la inyección intraperitoneal el método más empleado y eficaz (Adams, 2016; Alfatat et al., 2025; Du et al., 2022; Hamed et al., 2021; Makesh y Rajendran, 2022; Rathor y Swain, 2024; Tammas et al., 2024a).

Independientemente de las características citadas anteriormente, todas las vacunas presentan un componente común, los adyuvantes.

Tradicionalmente, los adyuvantes se han definido como compuestos que ayudan a potenciar la respuesta inmune adaptativa de los animales, así como a prevenir el desarrollo de la infección y la muerte por la administración de los fármacos. Sin embargo, se sabe que el papel de estas sustancias es fundamental y sumamente valioso, ya que al producirse una adecuada combinación antígeno/adyuvante, se aumenta la inmunogenicidad, ayudando a reducir la dosis de la vacuna, mejorando la absorción, ralentizando la metabolización del antígeno, y reduciendo los efectos secundarios (Adams, 2016; Elumalai et al., 2023; Makesh y Rajendran, 2022; Tammas et al., 2024a).

Hoy en día, la mayoría de las vacunas de uso comercial son formuladas con adyuvantes oleosos o emulsiones a base de aceite (mineral o no mineral), lo que proporciona la liberación lenta y constante de los antígenos desde el lugar de inoculación, prolongando la duración de la respuesta inmunitaria. Los ejemplos más comunes de adyuvantes oleoso a base de aceite son el *adyuvante completo de Freund*, (FCA), el *adyuvante incompleto de Freund* (FIA) y *Montanide™* que constituyen una serie de adyuvantes disponibles comercialmente basados en varias emulsiones de aceite formulados por la empresa Seppic (Paris, Francia) (Adams, 2016; Coscelli et al., 2015; Elumalai et al., 2023; Tammas et al., 2024a; Tammas et al., 2024b).

Los adyuvantes *Montanide™* a su vez, se pueden clasificar en 6 categorías según la formulación, destacando la gama “*Gel Montanide™*”, (adyuvantes poliméricos que se basan en una dispersión de partículas de gel de poliacrilato de sodio estables en agua) y “*Montanide™ ISA W/O*” (emulsiones de agua en aceite).

A pesar de que los adyuvantes son fundamentales en la formulación de una vacuna, su uso está acompañado de efectos secundarios y complicaciones, en especial aquellas vacunas administradas por inyección intraperitoneal. Esto se debe a que los adyuvantes actúan como estimulantes de la inflamación, atrayendo células inflamatorias y dando lugar a reacciones de melanización e inflamación, celomitis, adherencias entre órganos internos y la pared peritoneal, fibrosis y finalmente a la formación de granulomas, en especial alrededor de los ciegos pilóricos, páncreas y bazo, que en ocasiones se pueden distinguir macroscópicamente (Adams, 2016; Coscelli et al., 2015; Makesh y Rajendran, 2022; Tammas et al., 2024b).

Asimismo, la vacuna ideal debe ser segura para los peces, el personal que la administra, el medio ambiente y el consumidor final, con lo que el estudio y caracterización de la respuesta inmunitaria de los animales frente a este tipo de fármacos es esencial para conocer la eficacia de las mismas (Adams, 2016; Hamed et al., 2021; Moreira et al., 2021; Rathor y Swain, 2024).

### **1.2.1.- Sistema inmunitario de los peces.**

Para la formulación y desarrollo de vacunas en peces, así como su posterior aplicación, resulta crucial el conocimiento de su sistema inmunitario (Rathor y Swain, 2024).

Los peces teleósteos, como el rodaballo, presentan un sistema inmunitario complejo, con una organización y rutas de activación y señalización similares a los de los mamíferos. Sin embargo, hasta la fecha no se han descubierto peces con linfonodos o médula ósea, siendo estas, junto con la importante función hematopoyética del riñón, las diferencias más significativas (Buchmann y Secombes, 2022; Makesh y Rajendran, 2022; Tammas et al., 2024a).

El tejido hematopoyético y linfóide en los peces se distribuye en órganos linfoides primarios (timo y riñón cefálico), en los que se lleva a cabo la proliferación y maduración de los linfocitos T y B, y órganos linfoides secundarios (bazo y tejidos linfoides asociados a mucosas) (Buchmann y Secombes, 2022; Mkulo et al., 2024; Makesh y Rajendran, 2022; Tammas et al., 2024a). En cuanto al sistema inmunitario, este se puede clasificar en innato (no específico) y adaptativo (específico), dependiendo del tipo de respuesta inmunitaria que desencadena (Buchmann y Secombes, 2022; Mkulo et al., 2024).

El sistema inmunitario innato consta de mecanismos de defensa inespecíficos, es decir, pueden activarse sin necesidad de un contacto previo con el patógeno (Buchmann y Secombes, 2022). Comprende las barreras físicas (piel, mucosas, etc.), factores celulares (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos, macrófagos y melanomacrófagos, principalmente) y factores humorales, que incluyen sustancias antimicrobianas y proteínas de fase aguda (lisozima, citoquinas, proteína C, etc.) (Buchmann y Secombes, 2022; Mkulo et al., 2024; Makesh y Rajendran, 2022; Rathor y Swain, 2024; Tammas et al., 2024a).

Otras estructuras con función inmunitaria que se identifican en los teleósteos (como el rodaballo) son los centros de melanomacrófagos (MMC), localizados en órganos linfoides secundarios como el hígado, bazo y riñón. Estas formaciones consisten en agrupaciones de macrófagos pigmentados (melanomacrófagos), capaces de captar y retener antígenos exógenos a largo plazo. Aunque la función exacta de los MMC no está completamente esclarecida, se considera que pueden funciones análogas a los centros germinales de los mamíferos, ayudando a establecer la respuesta

inmunitaria específica (Buchmann y Secombes, 2022; Makesh y Rajendran, 2022; Tammam et al., 2024a).

El sistema inmunitario adaptativo, por su parte, presenta dos características fundamentales. Por un lado, desencadena una respuesta específica frente un antígeno determinado, gracias a la producción de anticuerpos especializados y, por otro lado, desarrolla la llamada “memoria inmunológica” (Adams, 2016; Buchmann y Secombes, 2022; Mkulo et al., 2024; Makesh y Rajendran, 2022; Tammam et al., 2024a).

La inmunidad celular adaptativa está mediada por los linfocitos T y B, mientras que la inmunidad humoral, al igual que en el caso de los mamíferos, se basa en la mediación de las inmunoglobulinas (Ig), siendo la IgM la inmunoglobulina principal (Adams, 2016; Buchmann y Secombes, 2022; Makesh y Rajendran, 2022; Rathor y Swain, 2024). La activación del sistema inmunitario adaptativo y la secreción de anticuerpos antígeno-específicos y células de memoria, es la base de la vacunación (Adams, 2016; Mkulo et al., 2024; Rathor y Swain, 2024; Tammam et al., 2024a).

Existen diferentes métodos para la determinación de la eficacia y seguridad de estos fármacos como: el cálculo del porcentaje relativo de supervivencia, el estudio del perfil de expresión génica inmunitaria mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la citometría de flujo y la espectrofotometría para evaluar la actividad antibacteriana, las técnicas de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para determinar los niveles de inmunoglobulinas, estudios histológicos para evaluar alteraciones morfológicas o las técnicas de inmunohistoquímica para detectar moléculas específicas de la respuesta inmunitaria, entre otros (Adams, 2016; Losada, 2013; Makesh y Rajendran, 2022; Ronza et al., 2020; Wangkahart et al., 2023).

En esta última herramienta, son de interés la detección de la inmunoglobulina M (IgM), el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) y de la caspasa-3 activa (C3A) (Bermúdez et al., 2006; Losada, 2013; Ronza et al., 2020).

La IgM se considera la inmunoglobulina más abundante en los peces y se puede expresar en la superficie de los linfocitos B o ser secretada al organismo (Buchmann y Secombes, 2022). Abunda especialmente en el suero y las mucosas (en el tejido linfoide asociado a mucosas), y entre sus funciones destacan la activación del complemento, activación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y la fagocitosis (Buchmann y Secombes, 2022).

Por su parte, el PCNA es un antígeno nuclear asociado a la proliferación celular (Kelman, 1997). Participa principalmente en la replicación y reparación del ADN, y en el control de ciclo celular,

así como en otros procesos relacionados como la apoptosis, el metabolismo y ensamblaje de la cromatina, la transcripción génica y la expresión de genes, por lo que se considera un marcador eficaz para la valoración de la proliferación celular (Kelman, 1997; Zhang et al., 2024).

Finalmente, la C3A pertenece al grupo de las proteasas intracelulares, relacionadas con el ciclo celular, y en concreto, con la apoptosis o muerte celular programada (Takle y Andersen, 2007). Esta enzima es activada en etapas tardías de la apoptosis y es imprescindible en procesos como la homeostasis de los tejidos, el desarrollo celular y la degradación de células dañadas o infectadas gracias a que cataliza la hidrólisis de un gran número de enzimas y proteínas celulares (Li et al., 2019; Long y Sun, 2016; Takle y Andersen, 2007).

### **1.2.2.- Técnicas histológicas para la evaluación de la respuesta vacunal.**

El procesado histológico hace referencia al conjunto de los métodos y técnicas aplicadas a una muestra de tejido para poder visualizarla al microscopio y realizar así un estudio histológico (Seco, 2002; Suvarna et al., 2019).

La histología básica o de rutina emplea una tinción conocida como Hematoxilina-Eosina (HE). Esta es una de las técnicas más empleadas para el estudio histopatológico y se fundamenta en una reacción ácido-base. Se utiliza la hematoxilina, una base como colorante nuclear (tiñe los núcleos de color violeta, ya que estos son ácidos) y la eosina, un ácido, como colorante citoplasmático (los citoplasmas de las células se tiñen de color rosa, son básicos) (Seco, 2002; Suvarna et al., 2019).

Por su parte, la inmunohistoquímica (IHQ) es una técnica cuyo objetivo es la detección específica de determinados antígenos celulares o tisulares mediante reacciones muy específicas antígeno-anticuerpo, lo que permite conocer su localización exacta en el organismo (Suvarna et al., 2019; Valle, 2022). Estas uniones se reconocen gracias al acoplamiento directo del anticuerpo primario, o de forma indirecta, a través del anticuerpo secundario. A su vez, estos anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales, proceder de diversos animales o ser diseñados de forma muy precisa para una especie en concreto (Suvarna et al., 2019; Valle, 2022).

Se trata de una técnica compleja, con múltiples variables experimentales a considerar. Sin embargo, su principal limitación radica en la ausencia de anticuerpos validados específicamente para la especie objeto de estudio, en este caso, el rodaballo, lo que puede derivar en la obtención de resultados anómalos como falsos negativos (Antuofermo et al., 2023).

Así pues, en la investigación inmunológica en peces, la falta de anticuerpos específicos y protocolos validados constituye una limitación importante (Antuofermo et al., 2023). Las técnicas

adaptadas de otras especies requieren ajustes experimentales (cambios en la recuperación antigénica, concentraciones de anticuerpos, tiempos de incubación...) lo que supone un mayor consumo de recursos y trabajo (Antuofermo et al., 2023). Aunque especies acuícolas como el rodaballo, la trucha y el lenguado disponen cada vez de más anticuerpos validados, sigue siendo esencial optimizar las técnicas para asegurar resultados fiables y reproducibles (Antuofermo et al., 2023; Ramos-Vara, 2005).

Por otro lado, es fundamental incluir y evaluar controles positivos y negativos en cada ensayo para garantizar la fiabilidad de la técnica. La presencia de marcaje en el control negativo o la ausencia de marcaje en el control positivo invalida los resultados obtenidos (Ramos-Vara, 2005; Valle, 2022).

Además, durante el proceso de fijación e inclusión en parafina, los antígenos de la muestra problema pueden quedar enmascarados, evitando que sean reconocidos por los anticuerpos, por lo que el primer paso en la inmunohistoquímica es el desenmascaramiento o recuperación antigénica, que permite exponer los epítomos (lugares del antígeno donde se unirá el anticuerpo) y posibilita la unión del anticuerpo (Suvarna et al., 2019; Valle, 2022). Este proceso depende de múltiples factores como el tiempo y tipo de fijación, la temperatura o el tipo de tejido, de modo que debe ser cuidadosamente optimizado según las condiciones del laboratorio (Suvarna et al., 2019; Valle, 2022).

Asimismo, para evitar falsos positivos, es imprescindible bloquear la actividad enzimática endógena presente fisiológicamente en los tejidos, ya que estas enzimas pueden reaccionar con el sustrato (Suvarna et al., 2019; Valle, 2022). Igualmente, pueden quedar expuestas moléculas tisulares que reaccionan de forma inespecífica con los anticuerpos, siendo necesario bloquear estas uniones inespecíficas o ruido de fondo con sueros o proteínas que saturen los sitios de unión, y asegurando, además, que no reaccionen con los anticuerpos empleados en la inmunohistoquímica (Suvarna et al., 2019; Valle, 2022).

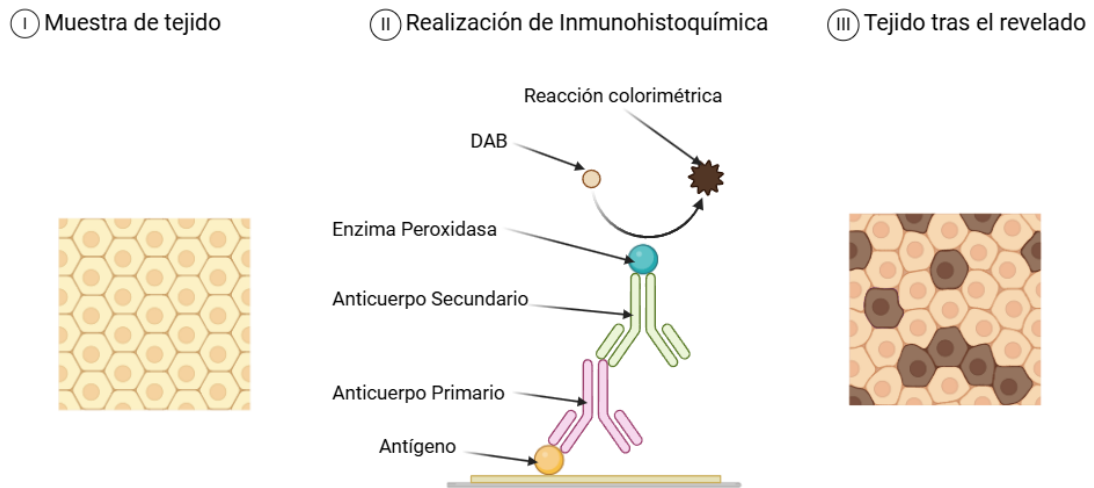
Tras estos pasos, se procede a la incubación con el anticuerpo primario, el reactivo más importante en esta técnica, ya que se va a unir de forma específica al antígeno de interés (IgM, PCNA o C3A) (Suvarna et al., 2019; Valle, 2022). Es crucial que se encuentre en las concentraciones adecuadas, siendo esta la modificación principal de los protocolos (Suvarna et al., 2019; Valle, 2022). A continuación, se añade el anticuerpo secundario, diseñado para unirse al anticuerpo primario, y cuya importancia radica en que está conjugado con una enzima marcadora, comúnmente la peroxidasa (Suvarna et al., 2019; Valle, 2022).

El revelado es el último paso de una inmunohistoquímica. Consiste en, bajo el microscopio óptico aplicar un sustrato-cromógeno, generalmente diaminobenzidina (DAB), que al reaccionar con la

enzima peroxidasa produce una reacción colorimétrica, permitiendo conocer la localización del antígeno de interés (Suvarna et al., 2019; Valle, 2022).

Posteriormente, las muestras se contrastan con hematoxilina de Harris (Suvarna et al., 2019; Valle, 2022).

En la *figura 1*, se esquematiza el proceso de la inmunohistoquímica.



*Figura 1.* Esquema de una inmunohistoquímica. Imagen propia creada con BioRender.com.



## **2.- OBJETIVOS**

Este Trabajo de Fin de Grado, se enmarca en una de las líneas de investigación desarrollada por el Grupo de Anatomía Patológica Veterinaria (GPAVET) (GI – 1707) de la Universidad de Santiago de Compostela, dentro del proyecto “Mejora de la capacidad de diagnóstico en acuicultura y sustentabilidad en la producción de pescado”, perteneciente al Programa de Ciencias Marinas de Galicia.

El objetivo principal de este estudio es evaluar las reacciones post-vacunales, especialmente las inducidas por los adyuvantes, en rodaballos vacunados por vía intraperitoneal, mediante técnicas morfológicas como la necropsia, la histopatología y la inmunohistoquímica.

En este sentido, los objetivos específicos son:

1. Caracterización morfológica de la reacción post-vacunal inducida por distintos adyuvantes vacunales en rodaballos.
2. Puesta a punto de inmunohistoquímica de IgM, PCNA y caspasa-3 activa en tejidos de rodaballo.
3. Estudio, a diferentes tiempos post-vacunales, la presencia y distribución tisular de IgM, PCNA y caspasa-3 activa en rodaballos vacunados con distintos adyuvantes.

### **3.- MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1.- TOMA DE MUESTRAS**

Los animales que se utilizaron en este estudio fueron rodaballos sanos con un peso de 20 g obtenidos de una granja local. Se mantuvieron en tanques de 250 L con agua de mar aireada y recirculada a 16° C y se alimentaron *ad libitum* con pienso comercial.

Se inmunizaron por la vía intraperitoneal el día 0, con una formulación vacunal que contenía antígeno (*Philasterides dicentrarchi*) y adyuvante (especificado a continuación).

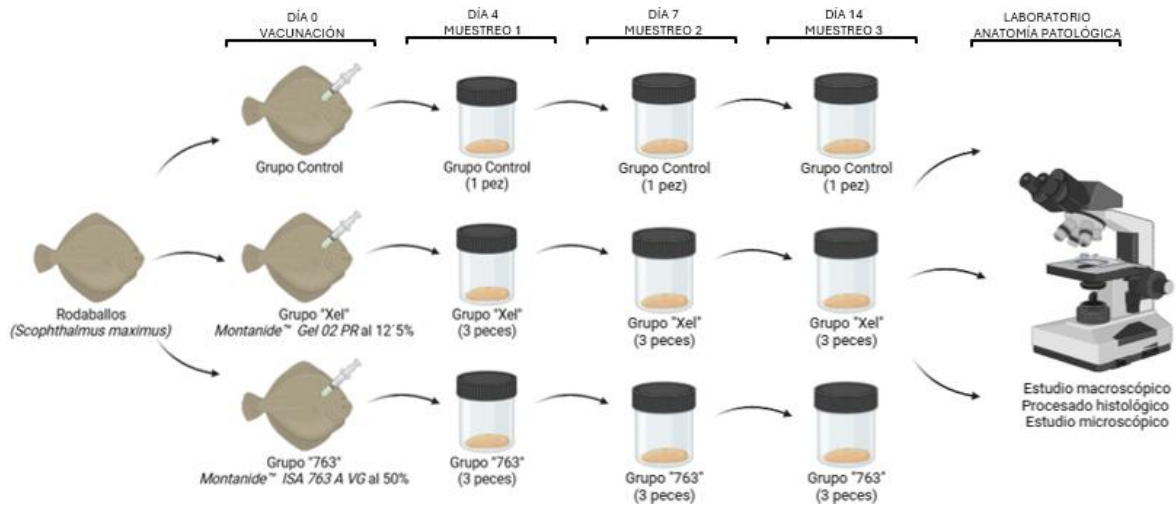
Todos los protocolos experimentales fueron diseñados cumpliendo con la legislación europea (Directiva 2010/63/UE) y española relacionada con el uso de animales para experimentación (Real Decreto 53/2013, Real Decreto 118/2021, Ley 32/2007 y la Orden ECC/566/2015) y fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Santiago de Compostela (España).

Los rodaballos estaban divididos en tres grupos experimentales, grupo control, grupo Xel y grupo 763, cuyas características se definen a continuación:

- Grupo Control: Peces no inmunizados.
- Grupo “Xel”: Peces inmunizados empleando vacunas con el adyuvante *Montanide™ Gel 02 PR* al 12'5% (adyuvante en base gel). Muestreo a los 4, 7 y a los 14 días post-vacunación.
- Grupo “763”: Peces inmunizados empleando vacunas con el adyuvante *Montanide™ ISA 763 A VG* al 50% (adyuvante en base aceite). Muestreo a los 4, 7 y a los 14 días post-vacunación.

El muestreo, se realizó siguiendo un protocolo estandarizado, muestreando aleatoriamente 3 rodaballos de cada grupo en cada tiempo de muestreo, a excepción del grupo control, que solo se muestreó un rodaballo en cada muestreo. Los peces se eutanasiaron con metanosulfonato de tricaina (*Tricaine PharmaQ, 1000 mg/g*) y se realizó una necropsia con la extracción de los diversos órganos. Se enviaron a la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela (USC) los órganos digestivos y el riñón de los 21 rodaballos en recipientes herméticos llenos de formol al 10% tamponado con sales de sodio fosfato.

En la *figura 2* se detalla de manera esquematizada el desarrollo del experimento, con los grupos de peces y tiempos de muestreo.



*Figura 2.* Esquema del desarrollo del experimento. Imagen propia creada con BioRender.com.

### 3.2.- PROCESADO DE LAS MUESTRAS PARA EL ESTUDIO HISTOLÓGICO

El procesado de las muestras se realizó siguiendo el protocolo rutinario que se emplea en el laboratorio.

En primer lugar, se llevó a cabo una documentación fotográfica y registro de las muestras en el que se anotaron las observaciones macroscópicas relevantes (reacciones granulomatosas o alteraciones en el tamaño de los órganos), para correlacionar los hallazgos macroscópicos con los microscópicos.

Las muestras fueron talladas mediante cortes transversales de aproximadamente 0,5 cm de grosor, con el fin de incluir en una misma sección los principales órganos abdominales (bazo, páncreas, hígado y sistema digestivo). Para cada pez, se preparó un casete con los órganos mencionados anteriormente, junto con el riñón, todos fijados en formol.

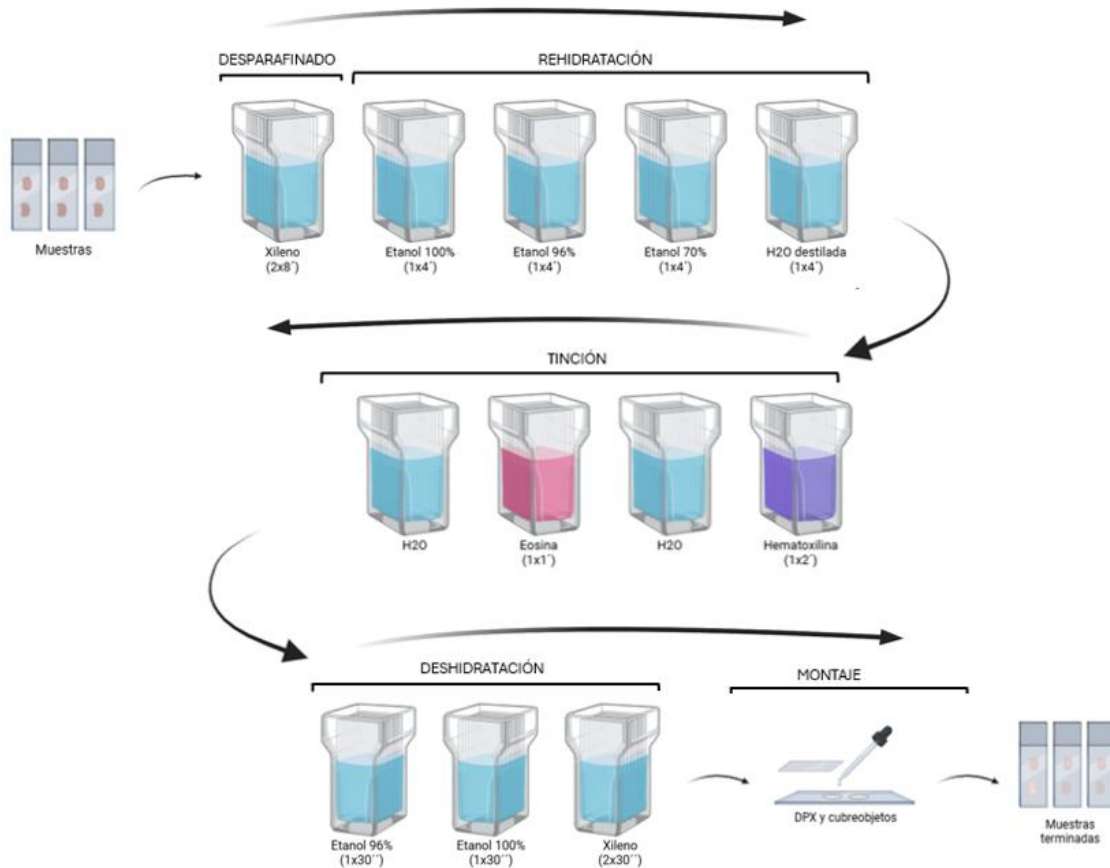
Posteriormente, en el procesador de tejidos, las muestras se deshidrataron en alcoholes en concentraciones crecientes (70%, 96%, 100%) y en un disolvente intermedio (xileno), para terminar en un baño de parafina líquida.

Se formaron los bloques de parafina y se cortaron en secciones de 2'5 µm con un microtomo. Las secciones se adhirieron a los portaobjetos. Destacar que, según la técnica posterior, se utilizaron portaobjetos convencionales (Hematoxilina-Eosina) o silanizados (Inmunohistoquímica).

Finalmente, los portaobjetos destinados a teñirse con Hematoxilina-Eosina se secaron en estufa a 56 °C durante una hora, mientras que los destinados para inmunohistoquímica, se almacenaron protegidos de la luz y se dejaron secar a temperatura ambiente (18-24°C).

### 3.3.- TINCIÓN CON HEMATOXILINA-EOSINA

La técnica de tinción con Hematoxilina – Eosina se realizó siguiendo los protocolos descritos por Bancroft en Suvarna et al., 2019. Se resume en la *figura 3*:



*Figura 3.* Esquema de tinción Hematoxilina-Eosina. Imagen propia creada con BioRender.com.

### 3.4.- INMUNOHISTOQUÍMICA

Para iniciar esta técnica, las muestras se desparafinaron y rehidrataron siguiendo el procesado rutinario de las muestras para histopatología explicado en el apartado “3.2.- *Procesado de las muestras para el estudio histológico*”.

Al principio del proceso, se siguieron los protocolos de inmunohistoquímica indicados por los laboratorios proveedores de cada anticuerpo. Sin embargo, dado que estos no habían sido previamente validados en rodaballo (con la excepción de la IgM), fue necesaria la puesta a punto de la técnica para esta especie. Para ello, se realizaron varias pruebas, introduciendo distintas modificaciones al protocolo original (*Tabla 1*).

Para la optimización de la técnica, tanto para el caso de la caspasa-3 activa como del PCNA, fue necesario probar diferentes concentraciones del anticuerpo primario, ya que, si se encuentra en concentraciones muy bajas no se consigue una unión adecuada, y si está en concentraciones

elevadas, el marcaje es excesivo, pudiendo llegar a ser un marcaje inespecífico en ambas ocasiones.

Tras el desparafinado y la rehidratación, el primer paso fue la recuperación antigénica, que en todos los casos (IgM, PCNA, y C3A) resultó ser una recuperación térmica. Esta consistió en sumergir unas cubetas con solución tampón (*Target Retrieval Solution*), a concentración 1:50, en una olla, a un pH bajo (*EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH - citrate buffer, pH 6'1, Agilent Technologies-Dako*) o pH alto (*EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH - Tris/EDTA, pH 9, Agilent Technologies-Dako*), según lo determinado por la casa comercial en el protocolo para cada anticuerpo. Se llevó a ebullición, alcanzando la temperatura adecuada cuando dicha solución se volvió turbia (indicador de temperatura por turbidez). Una vez alcanzada la turbidez, se sumergieron las muestras en estas cubetas y se esperó el tiempo de elección, procurando que se mantuviera la temperatura. Tras la recuperación antigénica, se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno empleando solución salina tamponada con fosfatos suplementada con un 0,1% de Tween 20 (*PBS-tween*).

Posteriormente, se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena, cubriendo e incubando a temperatura ambiente y en cámara húmeda las muestras con una solución comercial de peróxido de hidrógeno (*BLOXALL® Endogenous Blocking Solution, Vector Laboratories*). Al concluir el tiempo, se hicieron 3 lavados en *PBS- Tween*, de 5 minutos cada uno. De la misma manera, se hizo el bloqueo de las uniones inespecíficas o ruido de fondo, con un preparado comercial de suero normal de caballo (*Normal Horse Serum Blocking Solution, Vector Laboratories*) al 2,5%. Al finalizar el tiempo de incubación, no se lavaron los portaobjetos, si no que se drenó el exceso de reactivo.

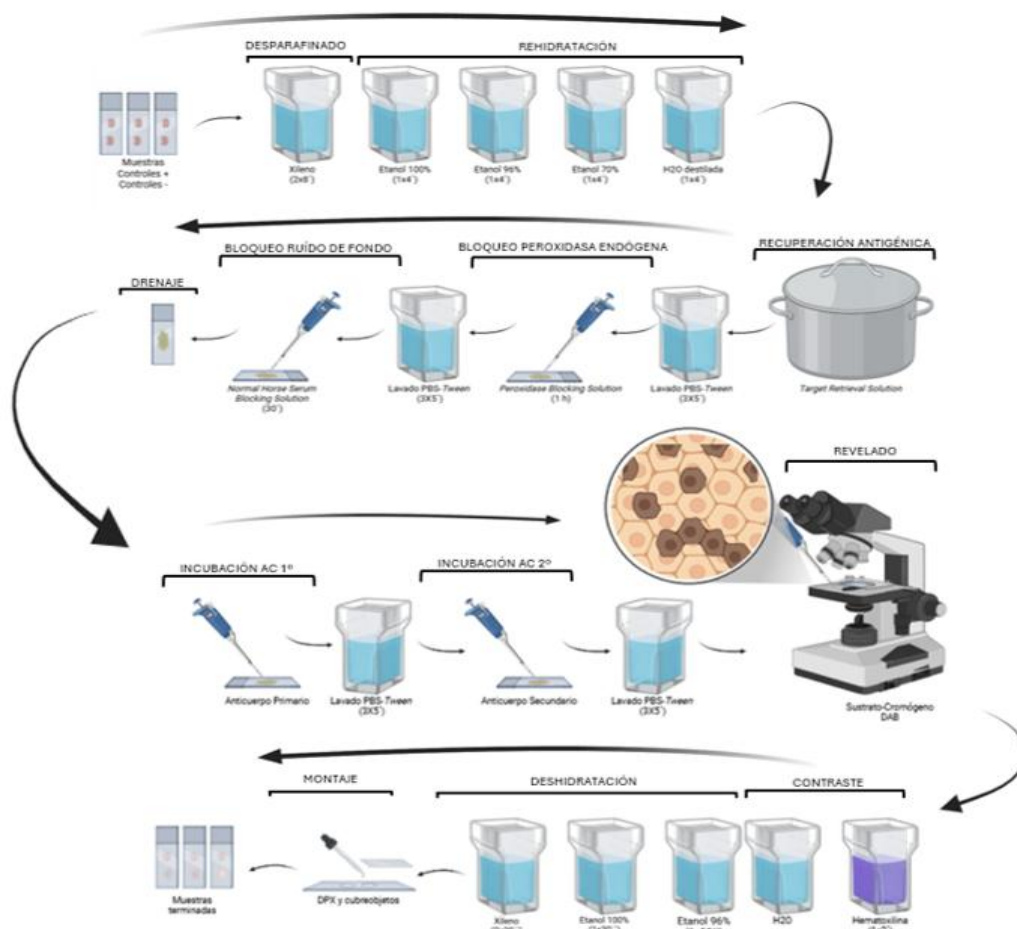
Finalmente, se añadieron los anticuerpos (primario y secundario) y el cromógeno. El anticuerpo primario empleado fue un anticuerpo policlonal de conejo frente IgM (diseñado por María Isabel Santos Rodríguez, miembro del grupo de investigación *DITAPREIN- Biotecnología para el diagnóstico, tratamiento y prevención de las enfermedades infecciosas*, perteneciente a la Universidad de Santiago de Compostela) o frente C3A (*Anti-ACTIVE® Caspasa-3 pAb, Promega™ Corporation*) o un anticuerpo monoclonal de ratón frente PCNA (*Monoclonal Mouse Anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen Clone PC10*) y se dejó incubar el tiempo determinado en cámara húmeda. Los controles negativos, en lugar de disolución de anticuerpo primario, se cubrieron con el reactivo de dilución de anticuerpos; de esta forma se garantizó que el protocolo varió lo mínimo posible con este tipo de muestras. Al concluir el tiempo de incubación del anticuerpo primario, se hicieron 3 lavados en *PBS- Tween*, de 5 minutos cada uno.

El anticuerpo secundario usado varió, dependiendo de si el anticuerpo primario era de conejo (*ImmPRESS®-VR Horse Anti-Rabbit IgG Polymer Reagent, Vector Laboratories*) o de ratón (*ImmPRESS®-VR Horse Anti-Mouse IgG Polymer Reagent, Vector Laboratories*). Este estaba conjugado con una enzima peroxidasa. Se incubó 30 minutos en cámara húmeda y al terminar se hicieron 3 lavados en *PBS-tween*, de 5 minutos cada uno.

El revelado fue el último paso de una inmunohistoquímica. Se empleó el diaminobenzidina (DAB) (*EnVision™ FLEX DAB+Chromogen, Agilent Technologies-Dako*), como sustrato-cromógeno, diluido a una concentración 1:50 en un buffer de sustrato específico (*EnVision™ FLEX Substrate Buffer, Agilent Technologies-Dako*). Primero se reveló el control negativo y a continuación el control positivo, que indicó el tiempo de revelado, que en todos los casos fue de aproximadamente 1 minuto.

Por último, las muestras se contrastaron con hematoxilina de Harris, se deshidrataron sumergiéndolas 30 segundos en alcoholes en concentraciones crecientes (etanol 96%, etanol 100%, etanol 100%) y se aclararon 2 baños de xileno de 30 segundos. Se montaron con medio soluble en tolueno y xileno (DPX).

El protocolo explicado anteriormente se resume en la *figura 4*.



*Figura 4.* Esquema de los pasos para la realización de una inmunohistoquímica. Imagen propia creada con BioRender.com.

Como tejidos controles positivos y controles negativos en todos los protocolos, se emplearon dos cortes histológicos de rodaballos. Cada antígeno o molécula que se quiso detectar presentó un protocolo específico, que se detalla a continuación en la *tabla 1*.

<b>PROTOCOLO/ANTICUERPO</b>	<b>IgM Rodaballo</b>	<b>PCNA</b>	<b>Caspasa-3 activa</b>
<i>RECUPERACIÓN ANTIGÉNICA</i>	Recuperación térmica <i>Low pH</i> 15 minutos	Recuperación térmica <i>Low pH</i> 5 minutos	Recuperación térmica <i>High pH</i> 20 minutos
<i>LAVADOS PBS- Tween.</i>	3 lavados de 5 minutos	3 lavados de 5 minutos	3 lavados de 5 minutos
<i>BLOQUEO DE LA PEROXIDASA ENDÓGENA</i>	<i>Endogenous Blocking Solution</i> 1 hora	<i>Endogenous Blocking Solution</i> 1 hora	<i>Endogenous Blocking Solution</i> 1 hora
<i>LAVADOS PBS- Tween</i>	3 lavados de 5 minutos	3 lavados de 5 minutos	3 lavados de 5 minutos
<i>BLOQUEO DE LAS UNIONES INESPECÍFICAS</i>	<i>Normal Horse Serum Blocking Solution</i> 30 minutos	<i>Normal Horse Serum Blocking Solution</i> 30 minutos	<i>Normal Horse Serum Blocking Solution</i> 30 minutos
<i>INCUBACIÓN ANTICUERPO PRIMARIO</i>	Anticuerpo policlonal de conejo frente IgM de Rodaballo 1:10 000 2 horas	Anticuerpo monoclonal de ratón frente PCNA 1:200 12 horas	Anticuerpo policlonal de conejo frente C3A 1:250 12 horas
			Anticuerpo policlonal de conejo frente C3A 1:300 12 horas
<i>LAVADOS PBS- Tween</i>	3 lavados de 5 minutos	3 lavados de 5 minutos	3 lavados de 5 minutos
<i>INCUBACIÓN ANTICUERPO SECUNDARIO</i>	<i>Horse Anti-Rabbit IgG</i> 30 minutos	<i>Horse Anti-Mouse IgG</i> 30 minutos	<i>Horse Anti-Rabbit IgG</i> 30 minutos
<i>LAVADOS PBS- Tween</i>	3 lavados de 5 minutos	3 lavados de 5 minutos	3 lavados de 5 minutos
<i>REVELADO</i>	<i>DAB+Chromogen</i> 1 minuto	<i>DAB+Chromogen</i> 1 minuto	<i>DAB+Chromogen</i> 1 minuto y 30 segundos

*Tabla 1.* Protocolos de inmunohistoquímica probados.

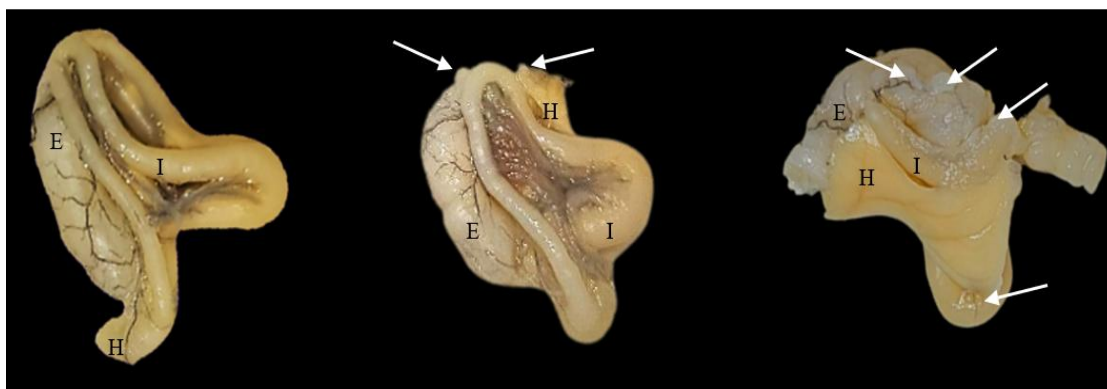
## 4.- RESULTADOS

### 4.1.- ESTUDIO MACROSCÓPICO

En la necropsia, tanto los peces vacunados con el adyuvante “Xel” o el adyuvante “763”, mostraron, en relación a los peces controles, cambios macroscópicos en los órganos abdominales.

En ambos grupos de peces, a los 14 días post-vacunación (dpv) se distinguió un material blanquecino, firme e irregular que cubría los órganos abdominales. Esta sustancia se encontraba adherida a la superficie de los órganos e incluso formando pequeños nódulos. En ocasiones provocaba adherencias entre órganos adyacentes.

La cantidad varió, de moderada en el grupo “Xel”, a grave en el grupo “763” (*Figura 5*).



*Figura 5.* Paquetes digestivos de peces controles (izquierda), vacunados con adyuvante “Xel”(centro) y adyuvante “763” (derecha). Se observa cantidad variable de material blanquecino adherido a la superficie de los órganos (círculo), estómago (E), intestino (I), hígado (H).

### 4.2.- ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

#### 4.2.1.- Adyuvante en base gel (“Xel”)

A los 4 días dpv, se observó una reacción inflamatoria leve, caracterizada por un infiltrado inflamatorio escaso y focal entre páncreas e intestino, compuesto principalmente por macrófagos, células epiteloides, linfocitos y granulocitos. Dichas células se disponían rodeando una sustancia amorfa eosinofílica, compatible con el adyuvante vacunal. En algunos casos, los macrófagos contenían pequeñas gotas intracitoplasmáticas, indicativas de fagocitosis del adyuvante (*Figura 6-A, 6-B*).

A los 7 dpv, la respuesta inflamatoria alcanzó un grado moderado, con un incremento del componente celular (*Figura 6-C*).



Para los 14 días dpv, la inflamación evolucionó a una peritonitis granulomatosa grave, con formación de granulomas asociados e infiltrado celular principalmente compuesto por células mononucleares. En la región central de la reacción inflamatoria, se identificó restos celulares y material amorfo acelular. En comparación con el día 4 dpv, los macrófagos mostraron menor cantidad de vacuolas con material fagocitado (*Figura 6-D*).

#### **4.2.2.- Adyuvante en base aceite ("763")**

A los 4 días dpv se identificó una reacción inflamatoria moderada, con infiltrados celulares organizados en torno a unas gotas redondeadas u ovaladas, homogéneas y transparentes, correspondientes al adyuvante en base aceite. El infiltrado celular escaso y heterogéneo, incluía células epitelioides, linfocitos y macrófagos, algunos con material fagocitado en su interior. En el páncreas se observaron zonas en las cuales, la reacción inflamatoria se infiltraba en la serosa (*Figura 6-E, 6-F*).

A los 7 días dpv, la inflamación evolucionó a grave. Los infiltrados inflamatorios peritoneales formaron múltiples granulomas en cuyo centro contenían vacuolas de tamaño variable, que correspondían a gotas de aceite del adyuvante (*Figura 6-G*).

Finalmente, a los 14 dpv se observó la formación de granulomas localizados en la superficie de la serosa del intestino, así como infiltración de la reacción inflamatoria al parénquima hepático y pancreático. Los granulomas se encontraban organizados alrededor de una sustancia oleosa condensada en vacuolas redondeadas u ovaladas de tamaño variable, compatible con el adyuvante vacunal. Se caracterizaban por la presencia de macrófagos y células epitelioides dispuestos en capas concéntricas. Algunos de los macrófagos contenían vacuolas ópticamente vacías y bien definidas dentro del citoplasma (*Figura 6-H*).

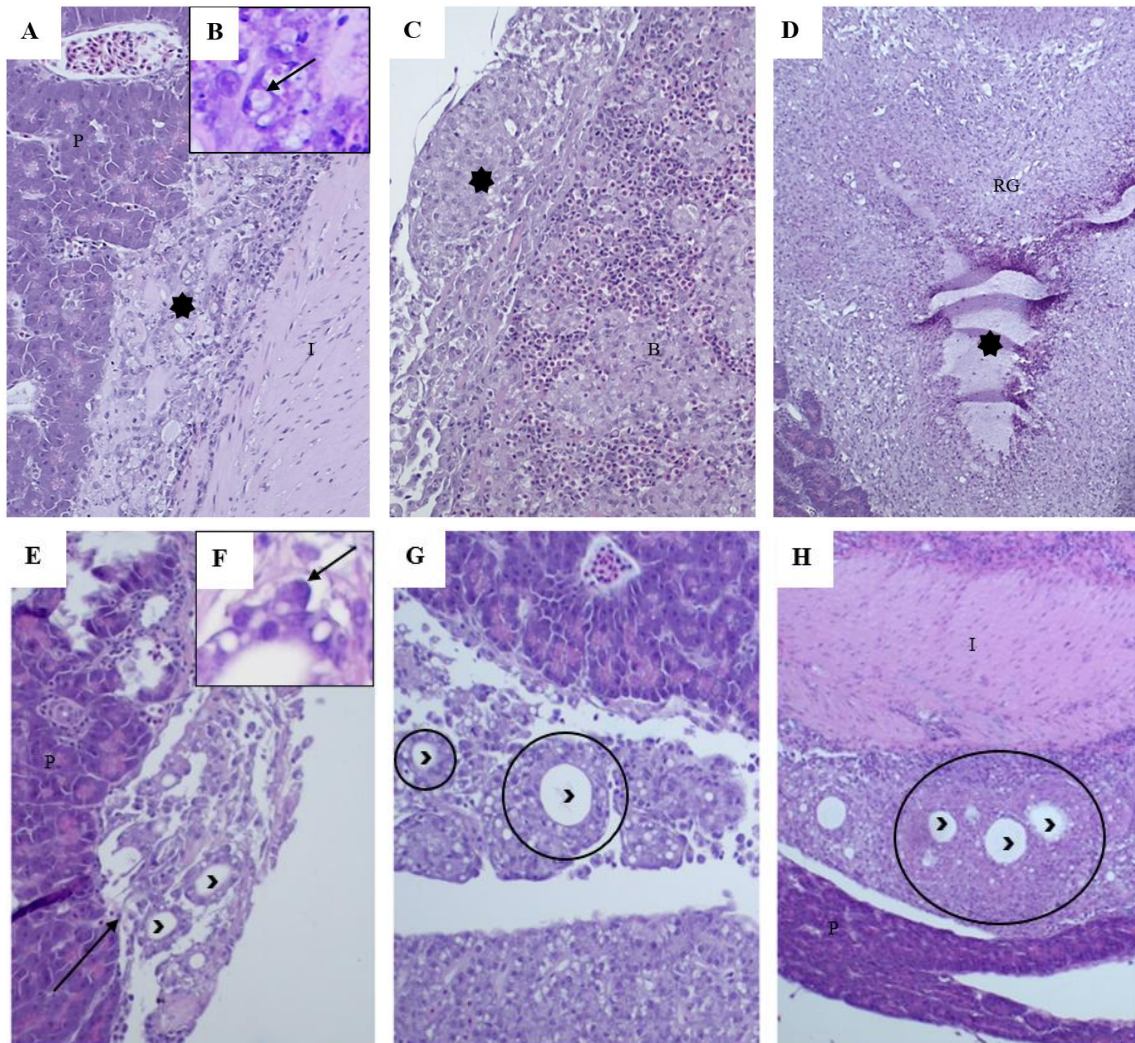


Figura 6. Secciones de órganos abdominales de rodaballos del grupo “Xel” y del grupo “763” 2’5  $\mu$ m (HE).

A. - 4 dpv. Reacción inflamatoria (asterisco) entre páncreas (P) e intestino (I), en torno al adyuvante vacunal (punta de flecha) (20x). B.- Detalle de macrófagos con pequeñas gotas intracitoplasmáticas (círculo) (40x).

C. - 7 dpv. Reacción inflamatoria (asterisco) en la periferia del bazo (B) (10x).

D.- 14 dpv. Detalle de la región central de la reacción granulomatosa (RG) rodeando material amorfo acelular (asterisco) (10x).

E.- 4 dpv. Reacción inflamatoria organizada en torno a vacuolas de adyuvante (punta de flecha). Se distinguen zonas de infiltración de la reacción inflamatoria en la serosa pancreática (flecha) (20x). F. - 4 dpv.- Detalle de macrófagos con pequeñas gotas fagocitadas (círculo) (40x).

G.- 7 dpv. Detalle de granulomas (círculo) al rededor del adyuvante vacunal (punta de flecha) (20x).

H.- 14 dpv. Reacción granulomatosa (círculo) en torno al adyuvante vacunal (punta de flecha) entre intestino (I) y páncreas (P) (4x).

### **4.3.- ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO**

#### **4.3.1.- Caracterización de células IgM<sup>+</sup>**

El primer protocolo probado (*Tabla 1*) para la inmunohistoquímica específica de IgM proporcionó resultados óptimos, por lo que no fueron necesarias modificaciones adicionales.

##### **- Adyuvante en base ("Xel")**

En los peces del grupo "Xel" a día 4 dpv se detectó inmunorreactividad positiva para IgM, localizada principalmente en la periferia de las áreas de inflamación y en células con una morfología típica de linfocitos. Estas células eran redondeadas o ligeramente ovaladas, con un núcleo central grande y redondo, y con escaso citoplasma (*Figura 7-A*).

A los 7 días dpv, se observó un incremento de células IgM<sup>+</sup> en la periferia de los focos inflamatorios. Además, las células positivas eran de mayor tamaño, correspondientes con células plasmáticas (*Figura 7-B*).

A los 14 días dpv, la cantidad de células IgM<sup>+</sup> en las áreas inflamatorias disminuyó, localizándose predominantemente en la periferia de los granulomas. Las zonas necróticas centrales rodeando una sustancia amorfa eosinófila presentaban marcaje (*Figura 7-C, 7-D*).

##### **- Adyuvante en base aceite ("763")**

En el grupo "763", en el primer muestreo, a día 4 dpv se observaron escasas células positivas para IgM. Estas células estaban localizadas en la periferia de las áreas de inflamación y presentaban una morfología típica de linfocitos (redondeadas u ovaladas, con un núcleo central grande y redondo, y con escaso citoplasma). Se detectó también un marcaje difuso y leve de IgM en el infiltrado inflamatorio, con mayor intensidad alrededor de las vacuolas de aspecto lipídico, compatibles con el adyuvante (*Figura 7-E*).

A los 7 días dpv, se intensificó el marcaje para IgM, particularmente en la periferia de los focos inflamatorios, granulomas y alrededor de las vacuolas. Así mismo, hubo un incremento general en el número de células positivas (*Figura 7-F*).

A los 14 días dpv la inmunorreactividad para IgM se restringió a la periferia de los granulomas; en el centro de estos no se detectó marcaje. Las células positivas, en general eran menos abundantes. Tenían aspecto compatible con linfocitos o algunas de tamaño mayor similares a células plasmáticas (*Figura 7-G*).

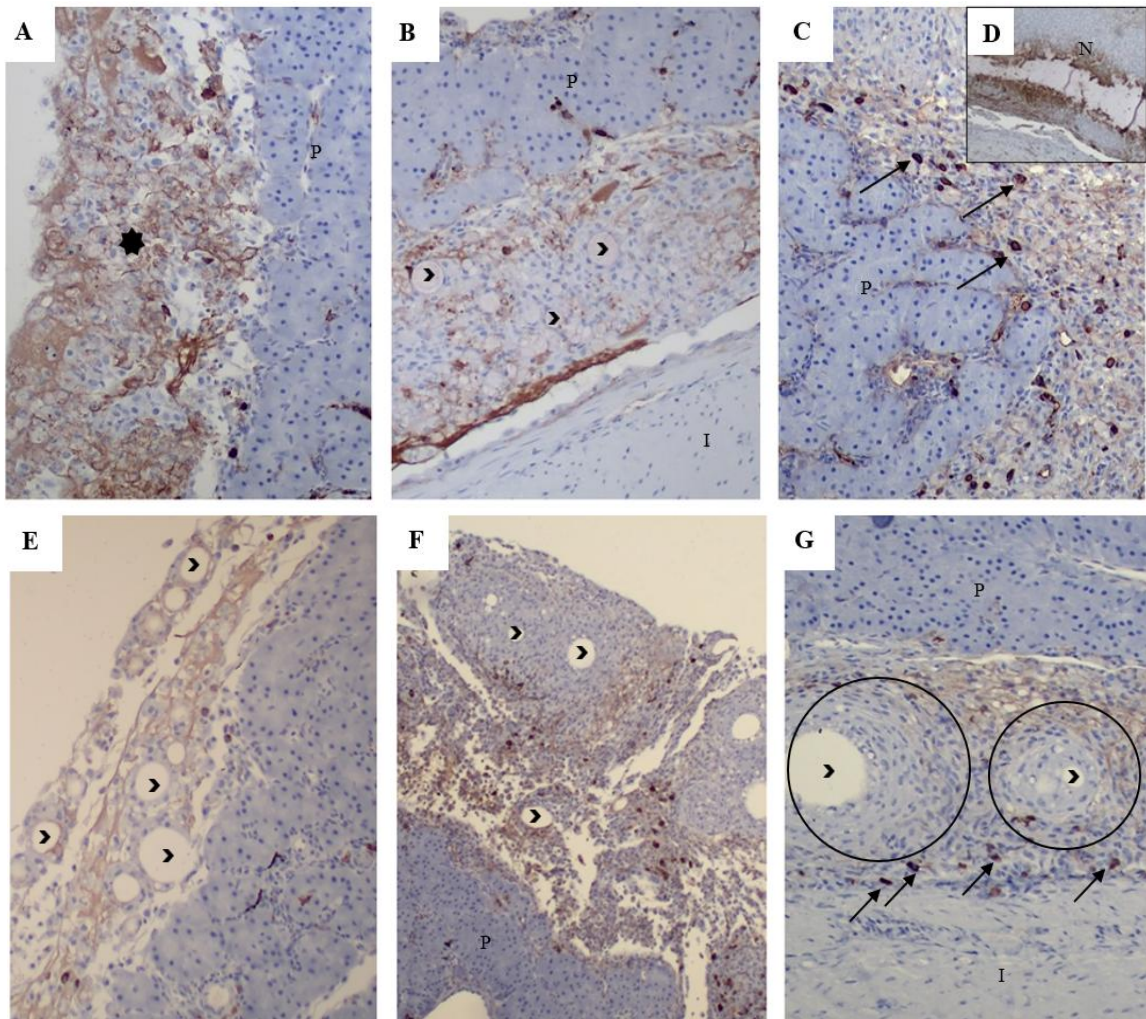


Figura 7. Secciones de órganos abdominales de rodaballos del grupo “Xel” y del grupo “763” 2’5  $\mu\text{m}$  (IgM)

A.- 4 dpv. Detalle de área IgM<sup>+</sup> (asterisco) en la periferia de la reacción inflamatoria en la proximidad del páncreas (P) (20x).

B.- 7 dpv. Reacción inflamatoria entre intestino (I) y páncreas (P) con numerosas células IgM<sup>+</sup> en la periferia. Presencia de restos de adyuvante vacunal (punta de flecha) (20x).

C.- 14 dpv. Detalle de células IgM<sup>+</sup> compatibles con células plasmáticas (círculo) en reacción inflamatoria al lado del páncreas (P) (20x). D.- Detalle de zona necrótica central con marcaje IgM<sup>+</sup> (flecha) (20x).

E.- 4 dpv. Marcaje difuso para IgM en todo el infiltrado inflamatorio organizado en torno a vacuolas de adyuvante (punta de flecha) (20x).

F.- 7 dpv. Células IgM<sup>+</sup> en la periferia de los granulomas y alrededor de las vacuolas (punta de flecha). Se visualiza el páncreas (P) (10x).

G.- 14 dpv. Detalle de inmunopositividad para IgM restringida a la periferia de los granulomas (círculo) en torno al adyuvante vacunal (punta de flecha). Se distinguen escasas células IgM<sup>+</sup> (flecha). Granulomas entre intestino (I) y páncreas (P) (20x).

#### **4.2.2.- Caracterización de células PCNA<sup>+</sup>**

Como se puede ver en la *tabla 1*, para la detección de la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) únicamente se probó un protocolo de inmunohistoquímica, ya que el marcaje fue adecuado.

##### **- Adyuvante en base gel ("Xel")**

En los peces del grupo "Xel", a los 4 días dpv se detectó inmunopositividad para PCNA diseminada, tanto en el interior como en la periferia del infiltrado inflamatorio. Las células positivas mostraron una morfología variada; redondas u ovaladas con un núcleo grande, redondo y central, típico de linfocitos; células grandes, redondeadas u ovoides con núcleo central y de gran tamaño, características de las células plasmáticas (*Figura 8-A*).

A los 7 días dpv, el marcaje disminuyó en el centro del foco inflamatorio, manteniéndose más intenso en la periferia. Esto se debe a que las células PCNA<sup>+</sup> se concentraron en las áreas marginales de la reacción inflamatoria (*Figura 8-B*).

La distribución descrita anteriormente, se mantuvo en el último tiempo de muestreo. A los 14 días dpv, la positividad para PCNA se restringió exclusivamente a las regiones periféricas de los granulomas. Las células inmunopositivas mantuvieron las características morfológicas descritas a los 4 días (*Figura 8-C*).

##### **- Adyuvante en base aceite ("763")**

En el grupo "763", a los 4 días dpv se observaron numerosas células PCNA<sup>+</sup> en el infiltrado inflamatorio. Las células positivas estaban diseminadas por toda el área inflamatoria, y mostraron una morfología similar a la descrita para el grupo "Xel". La intensidad del marcaje fue leve (*Figura 8-D*).

A los 7 días dpv, se evidenció un patrón de marcaje similar a la observada en el grupo "Xel". Las áreas de marcaje con células positivas se localizaron en la región periférica de los focos inflamatorios. Estas zonas estaban asociadas a vacuolas de aspecto lipídico, compatibles con depósitos del adyuvante en base aceite (*Figura 8-E*).

Finalmente, a los 14 días dpv, se registró una disminución general en el número de células inmunopositivas para PCNA, manteniéndose con una localización similar a la que presentaban a día 7, es decir, en la periferia de los granulomas. Las células PCNA<sup>+</sup> mantuvieron las características morfológicas descritas anteriormente (*Figura 8-F*).

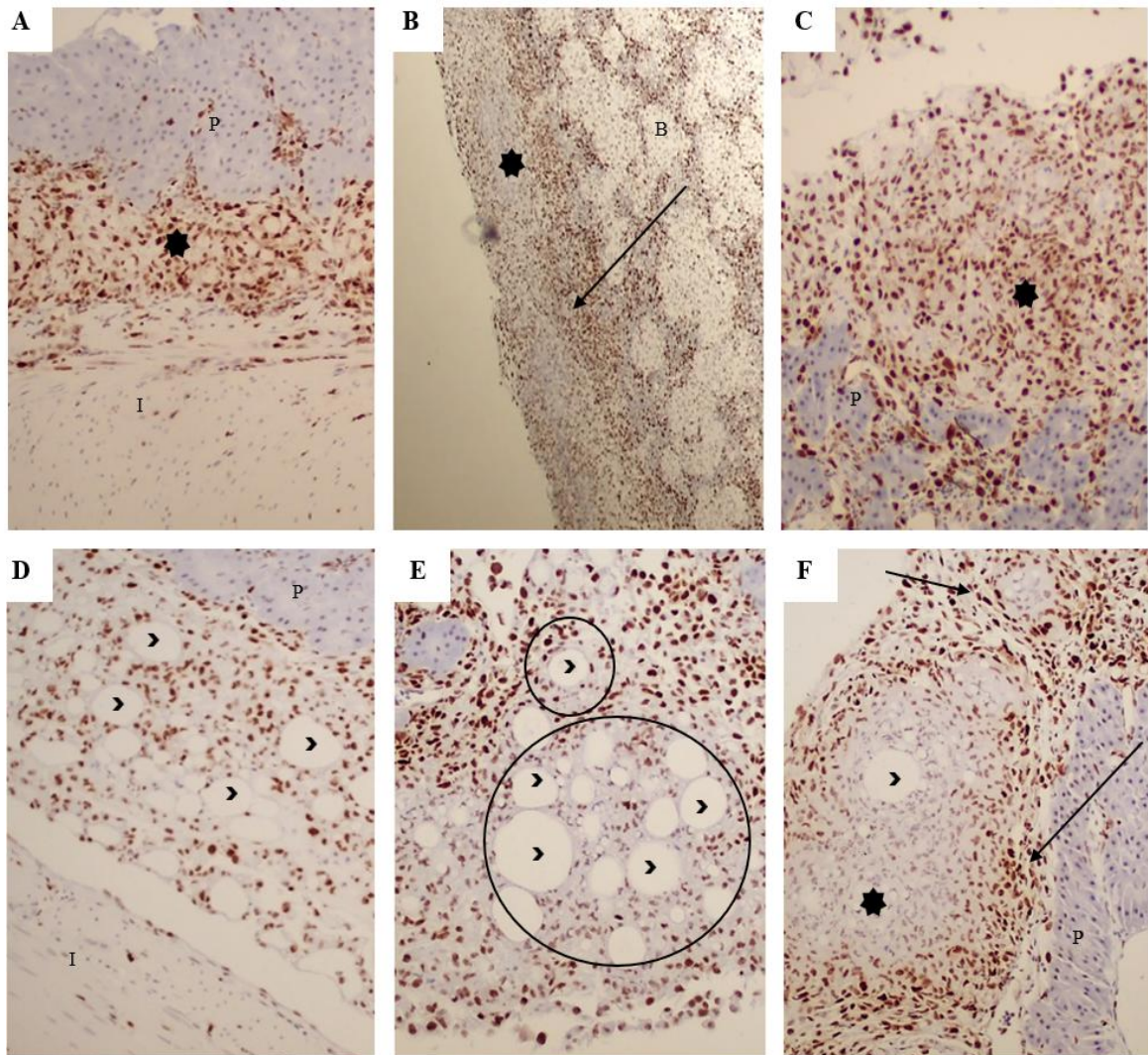


Figura 8. Secciones de órganos abdominales de rodaballos del grupo “Xel” y del grupo “763” 2’5  $\mu\text{m}$  (PCNA)

A.- 4 dpv. Infiltrado inflamatorio de células mononucleares (asterisco) entre páncreas (P) e intestino (I) con marcaje PCNA<sup>+</sup> (20x).

B.- 7 dpv. Infiltrado inflamatorio (asterisco) al lado del bazo (B) con marcaje PCNA<sup>+</sup> principalmente en las áreas periféricas (flecha) (10x).

C.- 14 dpv. Detalle del infiltrado inflamatorio (asterisco) al lado del páncreas (P) con marcaje PCNA<sup>+</sup> diseminado en toda el área inflamatoria (20x).

D.- 4 dpv. Detalle de marcaje difuso para PCNA en infiltrado inflamatorio entre páncreas (P) e intestino (I). Está organizado en torno a vacuolas de adyuvante (punta de flecha) (20x).

E.- 7 dpv. Detalle de abundantes células PCNA<sup>+</sup> en la periferia de los granulomas (círculo) y alrededor de las vacuolas (punta de flecha) (20x).

F.- 14 dpv. Totalidad de células inmunopositivas para PCNA (flecha) restringidas en la periferia del granuloma (asterisco) en la proximidad del páncreas (P) y rodeando al adyuvante vacunal (punta de flecha) (20x).

#### **4.3.3.- Caracterización de células Caspasa-3 activa<sup>+</sup>**

Para la detección de caspasa-3 activa (C3A), como indica la *tabla 1* se probaron dos protocolos en los cuales la variación principal fue la dilución del anticuerpo primario. En el primer procedimiento, el anticuerpo se encontraba a una dilución de 1:250, una concentración muy elevada, por lo que a la hora de revelar las muestras se vio un marcaje inespecífico.

La segunda dilución probada fue de 1:300, con la que se obtuvieron resultados óptimos, que son los explicados a continuación.

##### **- Adyuvante en base gel ("Xel")**

A los 4 días dpv, en las muestras del grupo "Xel" no se detectaron células positivas para C3A, indicando escasa actividad apoptótica en las fases iniciales de la respuesta inflamatoria.

A los 7 días dpv se observaron algunas células débilmente positivas localizadas en el interior del infiltrado inflamatorio. Estas células presentaron morfología variable (redondas, ovaladas, fusiformes...) y con citoplasma de aspecto granular (*Figura 9-A*).

En el último muestreo (14 días dpv), se registró una marcada inmunorreactividad focal para C3A, con abundantes células positivas distribuidas principalmente en el centro de las reacciones granulomatosas, coincidiendo con áreas de necrosis tisular (*Figura 9-B*).

##### **- Adyuvante en base aceite ("763")**

A los 4 días dpv, en las muestras correspondientes al grupo "763" se evidenciaron escasas células inmunopositivas para C3A. Estas células eran de aspecto variable, redondeadas con un núcleo grande y central, típico de linfocitos; células grandes, redondas u ovaladas, con núcleo central y de gran tamaño, características de las células plasmáticas (*Figura 9-C*).

A los 7 días dpv, se identificaron escasas células inmunopositivas, localizadas en el centro de los focos inflamatorios. Las células estaban distribuidas de manera focal, próximas a vacuolas ópticamente vacías, compatibles con depósitos del adyuvante. La mayoría de estas eran de gran tamaño y redondeadas (*Figura 9-D*).

A los 14 días dpv, el marcaje observado para C3A, continuó siendo débil. Las células C3A<sup>+</sup> se manifestaron en la periferia de los granulomas inflamatorios, rodeando los focos inflamatorios (*Figura 9-E*).

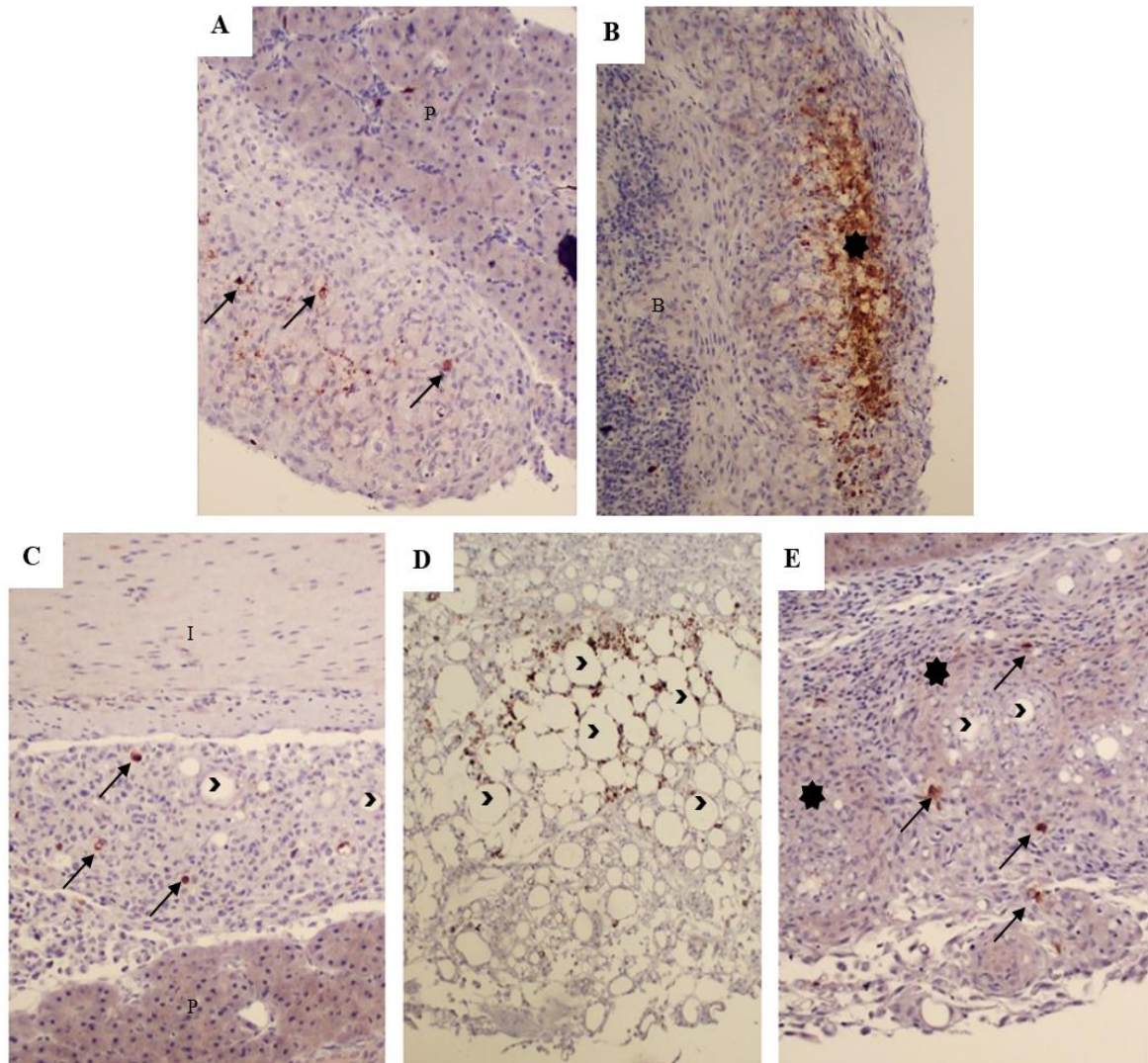


Figura 9. Secciones de órganos abdominales de rodaballos del grupo “Xel” y del grupo “763” 2’5 μm (CA3).

A.- 7 dpv. Células C3A<sup>+</sup> granular en el interior del infiltrado inflamatorio (asterisco) en la proximidad del páncreas (P) (20x).

B.- 14 dpv. Área C3A<sup>+</sup> (asterisco) en el centro del infiltrado inflamatorio al lado del bazo (B) (10x).

C.- 4 dpv. Células C3A<sup>+</sup> (flecha) en infiltrado inflamatorio entre páncreas (P) e intestino (I). Está organizado en torno a vacuolas de adyuvante (punta de flecha) (20x).

D.- 7 dpv. Detalle de marcaje para C3A (flecha) rodeando vacuolas de adyuvante (punta de flecha) (20x).

E.- 14 dpv. Escasas células inmunopositivas para C3A (flecha) restringidas a la periferia de los granulomas (asterisco) en torno al adyuvante vacunal (punta de flecha) (20x).



En la *tabla 2*, se recoge, de manera resumida, los hallazgos microscópicos más relevantes. El adyuvante en base gel (“Xel”) induce una inflamación progresiva y focal, con células IgM<sup>+</sup>, PCNA<sup>+</sup> y C3A<sup>+</sup>. En cambio, el adyuvante en base aceite (“763”) genera una inflamación más agresiva y difusa desde etapas tempranas, con formación rápida de granulomas, afectación de órganos internos y menor número de células IgM<sup>+</sup>, PCNA<sup>+</sup> y C3A<sup>+</sup>. Estos hallazgos reflejan respuestas inmunitarias distintas según el tipo de adyuvante empleado.

	<i>HE</i>	<i>IgM</i>	<i>PCNA</i>	<i>C3A</i>	
<b>XEL</b>	4D	- Inflamación leve. - Infiltrado con macrófagos, células epitelioides y linfocitos. - Sustancia eosinofílica amorfa (adyuvante). - Macrófagos con gotas intracitoplasmáticas.	- Células IgM <sup>+</sup> en periferia del infiltrado inflamatorio. - Linfocitos IgM <sup>+</sup> .	- Células PCNA <sup>+</sup> diseminadas por el infiltrado inflamatorio.	- Ausencia de marcaje.
	7D	- Inflamación moderada. - Mayor infiltrado celular.	- Aumento de células positivas en la periferia del foco inflamatorio. - Células plasmáticas IgM <sup>+</sup> .	- Células PCNA <sup>+</sup> en la periferia del infiltrado inflamatorio.	- Leve marcaje - Células C3A <sup>+</sup> diseminadas en infiltrado inflamatorio.
	14D	- Inflamación grave. - Granulomas con necrosis periférica. - Sustancia amorfa acelular. - Menor cantidad de vacuolas en macrófagos.	- Disminución de células IgM <sup>+</sup> en el foco inflamatorio. - Marcaje IgM <sup>+</sup> en la periferia del granuloma.	- Marcaje en periferia de granulomas. - Menor número de células PCNA <sup>+</sup> .	- Marcaje intenso en el centro de reacción inflamatoria. - Células C3A <sup>+</sup> en el centro de los granulomas
<b>763</b>	4D	- Inflamación moderada. - Infiltrado con macrófagos, células epitelioides y linfocitos. - Sustancia condensada en gotas ópticamente vacías. - Macrófagos con gotas intracitoplasmáticas.	- Marcaje leve y difuso. - Linfocitos IgM <sup>+</sup> rodeando vacuolas lipídicas.	- Células PCNA <sup>+</sup> diseminadas por el infiltrado inflamatorio.	- Ausencia de marcaje.
	7D	- Inflamación grave. - Inicio de formación de granulomas.	- Marcaje en torno a vacuolas de adyuvante.	- Abundante marcaje periférico. - Células PCNA <sup>+</sup> rodeando vacuolas de adyuvante.	- Marcaje débil - Células positivas rodeando vacuolas de adyuvante.
	14D	- Inflamación grave. - Granulomas - Depósitos de adyuvante en vacuolas. - Infiltración tisular de órganos abdominales (páncreas, bazo, hígado).	- Células IgM <sup>+</sup> en la periferia del granuloma.	- Abundantes células PCNA <sup>+</sup> en la periferia de los granulomas. - Menor número de células PCNA <sup>+</sup> .	- Marcaje escaso - Células C3A <sup>+</sup> en la periferia de los granulomas. - Menor número de células C3A <sup>+</sup> .

Tabla 2. Resumen de los resultados microscópicos obtenidos.

## **5.- DISCUSIÓN**

Actualmente, el desarrollo y uso de vacunas como estrategia preventiva frente enfermedades infecciosas, ha transformado la acuicultura. Estos fármacos constituyen una de las medidas más eficaces para la prevención y control de dichas patologías, permitiendo reducir el uso de antimicrobianos y minimizando las pérdidas económicas asociadas a brotes infecciosos (Hamed et al., 2021; Torres-Corral et al., 2021).

La eficacia vacunal depende de su capacidad para inducir una respuesta inmune eficaz, específica y duradera, especialmente del sistema inmunitario adaptativo (Adams, 2016; Makesh y Rajendran, 2022; Tammas et al., 2024a). En este contexto, los adyuvantes juegan un papel esencial, actuando como potenciadores de la respuesta inmunológica; sin embargo, su uso no está exento de efectos secundarios (Adams, 2016; Makesh y Rajendran, 2022; Tammas et al., 2024a; Tammas et al., 2024b).

Particularmente, en vacunas administradas por vía intraperitoneal, es frecuente la aparición de peritonitis difusa, granulomas y fibrosis como consecuencia de la respuesta inflamatoria local que estos adyuvantes pueden inducir (Adams, 2016; Makesh y Rajendran, 2022; Tammas et al., 2024b). Por tanto, resulta fundamental evaluar dichas reacciones inflamatorias para mejorar la seguridad de las formulaciones vacunales (Adams, 2016; Makesh y Rajendran, 2022; Tammas et al., 2024a; Tammas et al., 2024b).

El examen histológico de los tejidos permite caracterizar y estudiar los cambios tisulares inducidos por la vacunación, mientras que la inmunohistoquímica aporta información adicional mediante la identificación de moléculas específicas implicadas en la respuesta inmune. Para ello, se seleccionó el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) como animal modelo debido a que, en Galicia, es una de las producciones acuícolas que más peso tiene en el sector (APROMAR, 2024).

En la literatura, existen pocos estudios en los que se hayan probado vacunas comerciales o experimentales en rodaballo (Coscelli et al., 2015).

Para valorar las alteraciones tisulares, y así la seguridad de la vacuna, en este trabajo se optó por una tinción histológica de rutina, tinción Hematoxilina – Eosina y una valoración descriptiva, basada la extensión del daño tisular y la intensidad de la respuesta inflamatoria, el tipo de reacción inflamatoria y sus componentes, o la infiltración en los órganos adyacentes.

Paralelamente, la inmunohistoquímica complementó los resultados, mediante la detección específica de antígenos tisulares. Se identificaron la inmunoglobulina M (IgM), principal

anticuerpo sistémico de los teleósteos y marcador de respuesta humoral adaptativa temprana, así como un marcador de proliferación celular (PCNA) y un marcador de apoptosis celular (C3A).

No obstante, cabe destacar, las dificultades técnicas asociadas a la escasa disponibilidad de reactivos comerciales validados para esta especie y técnica, lo que dificultó la inmunolocalización de las moléculas de interés (Antuofermo et al., 2023; Ramos-Vara, 2005). Además, la inmunohistoquímica es una técnica larga y compleja, en la que intervienen varios factores (humedad, temperatura, tiempos de incubación y revelado, concentración de anticuerpos, entre otros) para garantizar buenos resultados y que, a su vez, sean reproducibles (Ramos-Vara, 2005; Suvarna et al., 2019; Valle, 2022).

Por lo tanto, el valor de este estudio radica en dos aspectos fundamentales: por un lado, la caracterización morfológica y estudio de las reacciones post-vacunales generadas por diferentes tipos de adyuvantes (“XeI” y “763”), contribuyendo al diseño de vacunas más seguras; y, por otro, en la puesta a punto de tres protocolos inmunohistoquímicos aplicados al estudio del sistema inmunitario en peces, ampliando así las herramientas diagnósticas disponibles en el ámbito de la ictiopatología.

## **5.1.- ESTUDIO MACROSCÓPICO E HISTOPATOLÓGICO**

La comparación de la respuesta inflamatoria inducida por los adyuvantes en base gel (grupo “XeI”) y en base aceite (grupo “763”) evidenció diferencias apreciables en la evolución, características y gravedad de la respuesta inflamatoria tras la vacunación intraperitoneal en rodaballo. Aunque ambos adyuvantes desencadenaron una respuesta inmunitaria que evolucionó hacia una peritonitis granulomatosa difusa grave a los 14 días dpv, los patrones iniciales de inflamación difirieron.

Esto se puede entender claramente al analizar los paquetes digestivos macroscópicamente, ya que, las lesiones observadas tanto en los peces del grupo “XeI” como en los del grupo “763” consistían en un material blanquecino, firme e irregular, adherido a la superficie de los órganos y que en ocasiones provocaba adherencias entre ellos. Estas lesiones, son similares a las descritas por Coscelli et al. (2015), en un estudio en el cual evaluaban la eficacia de una vacuna contra *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida*, en rodaballo.

Únicamente existían variaciones en cuanto a la cantidad, siendo más abundante y formando nódulos más vistosos en el grupo vacunando con el adyuvante en base aceite.

Sin embargo, al estudiar estos hallazgos microscópicamente, se observan variaciones y diferencias que no son evidentes en el examen macroscópico. Por ello, la combinación del análisis

macroscópico con el estudio histológico resulta fundamental para evaluar adecuadamente las respuestas inmunitarias frente a la vacunación, ya que lesiones con apariencia similar a simple vista pueden mostrar diferencias significativas a nivel tisular.

A día 4 dpv, el adyuvante en base gel (peces grupo "XeI") indujo una inflamación leve, con infiltrados celulares compuestos por macrófagos, linfocitos y neutrófilos, lo cual sugiere una respuesta inflamatoria local. En contraste, el adyuvante en base aceite (peces grupo "763") desencadenó una reacción moderada, caracterizada por la presencia de vacuolas, compatibles con el adyuvante, y rodeadas de macrófagos.

En ambos grupos, a los 14 días dpv se observó una evolución del infiltrado inflamatorio hacia un infiltrado de granulomatoso severo, con formación de granulomas en torno a una sustancia amorfa eosinofílica o transparente, compatible con los restos de los adyuvantes. Sin embargo, la reacción inflamatoria inducida por el adyuvante en base aceite (grupo "763") fue más marcada y de rápida evolución, con infiltración en los órganos vecinos (hígado, páncreas y bazo) desde los primeros días, mientras que en el adyuvante en base gel (grupo "XeI") la formación de granulomas no fue evidente hasta la segunda semana.

Este patrón inflamatorio ha sido previamente descrito en distintas especies de teleósteos vacunados con adyuvantes oleosos, como bacalao del Atlántico (Gjessing et al., 2011), salmón (Mutoloki et al., 2004; Koppang et al., 2005) o lubina (Afonso et al., 2005), todos reportando granulomas, infiltración tisular y adherencias viscerales atribuibles a la persistencia del adyuvante vacunal en el peritoneo y a la activación del sistema inmune.

En conjunto, estos hallazgos, ya resumidos por Tafalla et al. (2013) en salmón del Atlántico y lubina, reflejan que, aunque ambos adyuvantes son capaces de inducir una respuesta inmune eficaz desde el punto de vista de la activación de macrófagos (destacando la fagocitosis del adyuvante) y la formación de granulomas. Esta respuesta inflamatoria secundaria no es deseable desde un punto de vista productivo y de bienestar animal. Además, el perfil inflamatorio más extenso y abundante del adyuvante en base aceite (grupo "763") podría afectar negativamente el crecimiento post-vacunación y el bienestar, como también señalan Spinos et al. (2017) en lubinas y Mutoloki et al. (2004) en salmones.

En el caso concreto del rodaballo, los resultados obtenidos son similares con los descritos previamente por Noia et al. (2014) y Torres-Corral et al. (2021), quienes documentaron granulomas y daño tisular asociado al uso de vacunas con adyuvantes en base aceite. En relación al adyuvante en base gel, no hay resultados recogidos.

## **5.2.- ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO**

### **5.2.1.- Caracterización de IgM**

La determinación inmunohistoquímica de IgM permitió caracterizar la respuesta inmune humoral inducida por los adyuvantes en base gel (grupo “Xel”) y en base aceite (grupo “763”). Se observaron diferencias en la distribución y densidad de células IgM<sup>+</sup> entre los dos adyuvantes y los días post-vacunación, lo que refleja distintas fases de la activación del sistema inmune.

A los 4 días dpv, ambos grupos mostraron inmunopositividad para IgM en los infiltrados inflamatorios y el bazo, pero con patrones distintos. El adyuvante en base gel (grupo “Xel”) generó un marcaje periférico en los focos inflamatorios, con células IgM<sup>+</sup> de morfología compatible con linfocitos, sugiriendo un reclutamiento temprano de células asociadas a la respuesta inmune innata, como células presentadoras de antígenos con expresión superficial de IgM. (De Queiróz et al., 2024). Por el contrario, el adyuvante en base aceite (grupo “763”) generó una inmunopositividad más difusa, asociada a vacuolas lipídicas e indicando una inflamación inespecífica relacionada con la retención del adyuvante y una activación más prolongada del sistema inmune innato (Castro et al., 2017).

A los 7 días dpv, se observó un incremento notable en la cantidad de células IgM<sup>+</sup> en la reacción inflamatoria. En el grupo “Xel”, las células inmunopositivas para IgM se concentraron en la periferia de los focos inflamatorios. Presentaron un mayor tamaño, indicativo de una diferenciación funcional, coincidiendo con lo observado en truchas por Castro et al. (2017) tras la activación antigénica. El grupo “763”, también se intensificó la inmunorreactividad, en especial alrededor de las vacuolas. Este incremento de células IgM<sup>+</sup>, siguió la línea de lo descrito en otros estudios en diversas especies de teleosteos (Castro et al., 2017; Erkinharju et al., 2019; Ghasemishkaftaki et al., 2024) en los cuales a medida que pasaban los días tras la inoculación de la vacuna, el número de células de IgM<sup>+</sup> incrementaban.

A los 14 días dpv la cantidad de células IgM<sup>+</sup> disminuyó en los granulomas, concentrándose en la periferia del infiltrado inflamatorio, lo que indicaba que estas células no participaban activamente en la formación del granuloma (Coscelli et al., 2014b).

Estudios previos sobre vacunas en peces, especialmente con adyuvantes en base aceite, han evaluado la respuesta inmunitaria centrada en la IgM. Estos trabajos han usado técnicas como ELISA (Wangkahart et al., 2023) o PCR (Jaafar et al.) y coinciden en que los adyuvantes de este tipo aumentaban significativamente los niveles de IgM en suero y órganos linfoides, pero siempre provocaban una respuesta inflamatoria secundaria (Castro et al., 2017; Torres-Corral et al., 2021).

### **5.2.2.- Caracterización de PCNA**

La evaluación inmunohistoquímica de la expresión del antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA) reveló diferencias significativas entre los dos tipos de adyuvantes vacunales estudiados. Aunque en fases iniciales de la inflamación, ambos grupos mostraron una inmunopositividad similar, conforme avanzó el proceso, la respuesta inmunitaria del grupo “Xel”, tratado con adyuvante en base gel, adoptó un patrón más organizado de forma más rápida, en contraste con el grupo “763”, vacunado con el adyuvante en base aceite

En fases iniciales (día 4 dpv), ambos grupos presentaron una proliferación celular difusa, con células PCNA<sup>+</sup> distribuidas tanto en la periferia como en el centro del infiltrado. Esto pone de manifiesto una activación temprana del sistema inmune con proliferación de células inmunitarias en respuesta al estímulo antigénico, es decir, se desencadenó una respuesta inmunitaria innata (Zhang et al., 2022).

A los 7 días dpv, la proliferación celular en el grupo “Xel” se concentró en la periferia de los focos inflamatorios, mientras que en el grupo “763” se acumuló en torno a los granulomas y vacuolas, lo que sugiere una reacción inflamatoria crónica acompañada de una reducción en la actividad proliferativa de las células inmunes (Linden et al., 1992; Fajardo et al., 2023). Este hallazgo coincide con lo descrito por Knutsen et al. (2024) en peces lumpo del Atlántico (*Cyclopterus lumpus L.*) quienes documentaron la presencia de células PCNA<sup>+</sup> dispersas en el tejido inflamatorio circundante a los granulomas y a los depósitos lipídicos del adyuvante.

Finalmente, a los 14 días dpv, ambos grupos presentaron una disposición similar de células PCNA<sup>+</sup>, concentradas alrededor de los granulomas.

Aunque existen pocos estudios sobre la inmunolocalización tisular de PCNA en peces vacunados, su utilidad como marcador de proliferación celular y bienestar está bien documentada en diversas especies de teleósteos (Chikwati et al., 2013). Se ha empleado para evaluar procesos de regeneración tisular en infecciones parasitarias, como en el intestino de trucha común infectada por acantocéfalos (Dezfuli et al., 2012), en anguilas con nematodos (Dezfuli et al., 2016), o en bioensayos de toxicidad en peces (Ortego et al., 1995; Sanden y Olsvik, 2009).

Además de su papel proliferativo, PCNA participa en la modulación de la respuesta inmune innata, evitando una activación excesiva y descontrolada (Zhang et al., 2022). Este mecanismo regulador podría explicar la menor intensidad y mayor organización del infiltrado inflamatorio observada en el grupo “Xel”. Así mismo, estudios recientes en rodaballos, como el de Escribano et al. (2024), documentaron mediante PCR un incremento temprano y significativo en la expresión de PCNA tras la vacunación experimental, alcanzando su máximo a las 24 horas post-vacunación.

En conclusión, los resultados evidencian que el adyuvante en base gel genera una respuesta inflamatoria más moderada y focalizada; destacando el papel regulador de PCNA en el equilibrio de la respuesta inmune.

### **5.2.3.- Caracterización de Caspasa-3 activa**

La detección de la expresión caspasa-3 activa como marcador de apoptosis permitió evaluar el daño tisular inducido por la vacunación por ambos adyuvantes.

Aunque inicialmente, ambos grupos (“Xe1” y “763”) presentaron una baja actividad apoptótica, esta fue avanzando a medida que transcurrían los días post-vacunación. Esta progresión sugiere que la apoptosis aumenta conforme avanza la inflamación, con el estrés oxidativo y la acumulación de radicales libres, lo que, a su vez, indica un mayor grado de daño celular, tal y como ya se ha descrito en otros teleosteos en situaciones de parasitosis (Jantrakajorn et al., 2024).

Comparativamente, el adyuvante en base gel (grupo “Xe1”) indujo una apoptosis celular más intensa y localizada en el centro del infiltrado inflamatorio, mientras que el adyuvante en base aceite (grupo “763”) desencadenó una respuesta apoptótica más localizada y de menor intensidad, limitada a las zonas periféricas de los granulomas. Si se compara con el patrón de proliferación celular (predominante en la periferia), la localización de esta expresión es opuesta.

Estudios previos han demostrado que estímulos inflamatorios o tóxicos inducen la expresión de caspasas, incluyendo la caspasa-3 activa, en tejidos como hígado y branquias (Feng et al., 2017; Jia et al., 2020). Aunque los trabajos sobre detección inmunohistoquímica de caspasa-3 activa como marcador de apoptosis en peces vacunados son limitados, existe evidencia de su relación con procesos inflamatorios inducidos por microplásticos (Xu et al., 2023), hipoxia (Zhao et al., 2020) o dietas inadecuadas con isoleucina o ricas en grasa (Feng et al., 2017; Jia et al., 2020).

Además, el análisis de genes relacionados con la apoptosis, como *Anexina V*, *Bax*, *caspasa-6*, *-8* o *-9*, mediante PCR, citometría de flujo o ELISA, ha cobrado gran relevancia para comprender las vías moleculares implicadas en la respuesta inmune (Núñez-Díaz et al., 2017; Zhao et al., 2020). En particular, se ha observado que infecciones como la producida por *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* inducen una activación de caspasas (8 y 9), lo cual se correlaciona con una sobreexpresión de citocinas proinflamatorias y una activación de vías apoptóticas, especialmente en el hígado (Núñez-Díaz et al., 2017).

En conjunto, estos hallazgos respaldan la utilidad del análisis de C3A como herramienta histopatológica para caracterizar el efecto inmunomodulador de diferentes adyuvantes y propician futuras investigaciones sobre la interacción entre la inflamación y la apoptosis en peces.

## **6.- CONCLUSIONES**

- Histológicamente, ambos adyuvantes vacunales (“Xe1” y “763”) desencadenaron una respuesta inmune caracterizada por la formación de granulomas. Sin embargo, el adyuvante en base gel (grupo “Xe1”) indujo una inflamación más organizada, localizada y de evolución progresiva, mientras que el adyuvante en base aceite (grupo “763”) provocó una respuesta inflamatoria más intensa, precoz y persistente, con infiltración tisular y afectación de órganos abdominales.
- La técnica inmunohistoquímica, optimizada para esta especie, permitió caracterizar las distintas fases y tipos de respuesta inmunitaria inducida por los adyuvantes, así como los procesos de proliferación celular (PCNA), apoptosis celular (C3A) y respuesta humoral (IgM), ofreciendo una herramienta fundamental junto con la histopatología para el estudio inmunopatológico.
- La inmunohistoquímica de IgM, PCNA y caspasa-3 activa, evidenció diferencias entre los adyuvantes evaluados. El adyuvante en base gel (grupo “Xe1”) promovió una respuesta inflamatoria más organizada y localizada, con un patrón periférico de células IgM<sup>+</sup> y una proliferación celular (PCNA<sup>+</sup>) bien delimitada, pero con una actividad apoptótica más intensa y localizada en el centro (C3A<sup>+</sup>). En contraste, el adyuvante en base aceite (grupo “763”) indujo una respuesta inflamatoria más difusa y persistente, con acumulación de células IgM<sup>+</sup> alrededor de vacuolas, células PCNA<sup>+</sup> distribuidas en torno a granulomas y una apoptosis celular más débil y periférica (C3A<sup>+</sup>).



## 7.- BIBLIOGRAFÍA

- Adams, A. (2016). *Fish vaccines*. Springer.
- Afonso, A., Gomes, S., Da Silva, J., Marques, F., & Henrique, M. (2005). *Side effects in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) due to intraperitoneal vaccination against vibriosis and pasteurellosis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 19(1), 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.001>
- Alfatat, A., Amoah, K., Cai, J., Huang, Y., Fachri, M., Lauden, H. N., Lyu, S., Wang, X., Maulu, S., Asiedu, B., & Syaifiuddin, S. (2025). *Sustainable aquaculture and sea ranching with the use of vaccines: a review*. *Frontiers In Marine Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmars.2024.1526425>
- Antuofermo, E., Orioles, M., Murgia, C., Burrari, G. P., Penati, M., Gottardi, C., Polinas, M., Volpatti, D., Galeotti, M., & Addis, M. F. (2023). *Exploring Immunohistochemistry in Fish: Assessment of Antibody Reactivity by Western Immunoblotting*. *Animals*, 13(18), 2934. <https://doi.org/10.3390/ani13182934>
- APROMAR. (2024). *La acuicultura en España 2024*. Recuperado de [https://apromar.es/wp-content/uploads/2025/03/Informe2024\\_v1.4.pdf](https://apromar.es/wp-content/uploads/2025/03/Informe2024_v1.4.pdf)
- Bermúdez, R., Vigliano, F., Marcaccini, A., Sitjà-Bobadilla, A., Quiroga, M., & Nieto, J. (2006). *Response of Ig-positive cells to *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) experimental infection in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.): A histopathological and immunohistochemical study*. *Fish & Shellfish Immunology*, 21(5), 501-512. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.02.006>
- Buchmann, K., & Secombes, C. J. (2022). *Principles of Fish Immunology: From Cells and Molecules to Host Protection*. Springer.
- 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*. *Developmental & Comparative Immunology*, 70, 119-127. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.01.012>
- Chikwati, E. M., Gu, J., Penn, M. H., Bakke, A. M., & Krogdahl, Å. (2013). *Intestinal epithelial cell proliferation and migration in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: effects of temperature and inflammation*. *Cell And Tissue Research*, 353(1), 123-137. <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1631-9>

- Coscelli, G. A., Bermúdez, R., Losada, A. P., Faílde, L. D., Santos, Y., & Quiroga, M. I. (2014). *Acute Aeromonas salmonicida infection in turbot (Scophthalmus maximus L.). Histopathological and immunohistochemical studies.* Aquaculture, 430, 79-85. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.002>
- Coscelli, G. A., Bermúdez, R., Silva, A. R. S., De Ocenda, M. V. R., & Quiroga, M. I. (2014b). *Granulomatous dermatitis in turbot (Scophthalmus maximus L.) associated with natural Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida infection.* Aquaculture, 428-429, 111-116. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.02.038>
- Coscelli, G. A., Bermúdez, R., Losada, A. P., Santos, Y., & Quiroga, M. I. (2015). *Vaccination against Aeromonas salmonicida in turbot (Scophthalmus maximus L.): Study of the efficacy, morphological changes and antigen distribution.* Aquaculture, 445, 22-32. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.04.011>
- Costa, J. Z., McCarthy, Ú., Perez, O., Ramos, E., Rodriguez, M., Monterroso, O., & Riera, R. (2017). *Occurrence of Photobacterium damsela Subsp. Piscicida in Sea-Cage Farmed Meagre (Argyrosomus regius) in Tenerife, Canary Islands, Spain.* Thalassas An International Journal of Marine Sciences, 33(1), 65-71. <https://doi.org/10.1007/s41208-017-0022-5>
- De Queiróz, G. A., Silva, T. M. F. E., & Leal, C. A. G. (2024). *Duration of Protection and Humoral Immune Response in Nile Tilapia (Oreochromis niloticus L.) Vaccinated against Streptococcus agalactiae.* Animals, 14(12), 1744. <https://doi.org/10.3390/ani14121744>
- Dezfuli, B. S., Giari, L., Lui, A., Squerzanti, S., Castaldelli, G., Shinn, A. P., Manera, M., & Lorenzoni, M. (2012). *Proliferative cell nuclear antigen (PCNA) expression in the intestine of Salmo trutta trutta naturally infected with an acanthocephalan.* Parasites & Vectors, 5(1). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-198>
- Dezfuli, B. S., Manera, M., Bosi, G., DePasquale, J. A., D'Amelio, S., Castaldelli, G., & Giari, L. (2016). *Anguilla anguilla intestinal immune response to natural infection with Contracaecum rudolphii A larvae.* Journal of Fish Diseases, 39(10), 1187-1200. <https://doi.org/10.1111/jfd.12455>
- Du, Y., Hu, X., Miao, L., & Chen, J. (2022). *Current status and development prospects of aquatic vaccines.* Frontiers In Immunology, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1040336>

- Duff, D. C. B. (1942). *The Oral Immunization of Trout Against Bacterium Salmonicida*. The Journal Of Immunology, 44(1), 87-94. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.44.1.87>
- Elumalai, P., Thompson, K., & Lakshmi, S. (2023). *Fish vaccines: Health Management for Sustainable Aquaculture*. CRC Press.
- Erkinharju, T., Strandskog, G., Vågnes, Ø., Hordvik, I., Dalmo, R. A., & Seternes, T. (2019). *Intramuscular vaccination of Atlantic lumpfish (Cyclopterus lumpusL.) induces inflammatory reactions and local immunoglobulin M production at the vaccine administration site*. Journal of Fish Diseases, 42(12), 1731-1743. <https://doi.org/10.1111/jfd.13101>
- Escribano, M. P., Balado, M., Santos, B., Toranzo, A. E., Lemos, M. L., & Magariños, B. (2024). *Outer Membrane Vesicles (OMVs) from Tenacibaculum maritimum as a Potential Vaccine Against Fish Tenacibaculosis*. Fish & Shellfish Immunology, 154, 109943. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2024.109943>
- Faílde, L. D., Losada, A. P., Bermúdez, R., Santos, Y., & Quiroga, M. I. (2013). *Tenacibaculum maritimum infection: Pathology and immunohistochemistry in experimentally challenged turbot (Psetta maxima L.)*. Microbial Pathogenesis, 65, 82-88. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2013.09.003>
- Fajardo, C., Santos, P., Passos, R., Vaz, M., Azeredo, R., Machado, M., Fernández-Boo, S., Baptista, T., & Costas, B. (2023). *Early Molecular Immune Responses of Turbot (Scophthalmus maximus L.) Following Infection with Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida*. International Journal of Molecular Sciences, 24(16), 12944. <https://doi.org/10.3390/ijms241612944>
- FAO. (2009). *Desarrollo de la Acuicultura. Orientaciones Técnicas para la Pesca Responsable*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO).
- FAO. (2024). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2024 – Blue Transformation in action*. Rome. <https://doi.org/10.4060/cd0683en>
- Feng, L., Gan, L., Jiang, W., Wu, P., Liu, Y., Jiang, J., Tang, L., Kuang, S., Tang, W., Zhang, Y., & Zhou, X. (2017). *Gill structural integrity changes in fish deficient or excessive in dietary isoleucine: Towards the modulation of tight junction protein, inflammation, apoptosis and antioxidant defense via NF-κB, TOR and Nrf2 signaling pathways*. Fish & Shellfish Immunology, 63, 127-138. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.02.010>

- Fernández-González, R., Pérez-Pérez, M., & Garza-Gil, M. D. (2020). *An analysis of production factors for Galician-farmed turbot: From boom to stagnation*. *Aquaculture Economics & Management*, 25(3), 320-338. <https://doi.org/10.1080/13657305.2020.1840659>
- Fraga-Corral, M., Ronza, P., Garcia-Oliveira, P., Pereira, A., Losada, A., Prieto, M., Quiroga, M., & Simal-Gandara, J. (2021). *Aquaculture as a circular bio-economy model with Galicia as a study case: How to transform waste into revalorized by-products*. *Trends In Food Science & Technology*, 119, 23-35. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.11.026>
- Garza-Gil, M. D., Surís-Regueiro, J. C., & Varela-Lafuente, M. M. (2017). *Using input–output methods to assess the effects of fishing and aquaculture on a regional economy: The case of Galicia, Spain*. *Marine Policy*, 85, 48-53. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2017.08.003>
- Ghasemieshkaftaki, M., Cao, T., Hossain, A., Vasquez, I., & Santander, J. (2024). *Haemato-Immunological Response of Immunized Atlantic Salmon (Salmo salar) to Moritella viscosa Challenge and Antigens*. *Vaccines*, 12 (1), 70. <https://doi.org/10.3390/vaccines12010070>
- Gjessing, M. C., Falk, K., Weli, S. C., Koppang, E. O., & Kvellestad, A. (2011). *A sequential study of incomplete Freund's adjuvant-induced peritonitis in Atlantic cod*. *Fish & Shellfish Immunology*, 32(1), 141-150. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.11.003>
- Hamed, S. B., Tapia-Paniagua, S. T., Moriñigo, M. Á., & Ranzani-Paiva, M. J. T. (2021). *Advances in vaccines developed for bacterial fish diseases, performance and limits*. *Aquaculture Research*, 52(6), 2377-2390. <https://doi.org/10.1111/are.15114>
- Iglesias, R., Paramá, A., Alvarez, M., Leiro, J., Fernández, J., & Sanmartín, M. (2001). *Philasterides dicentrarchi (Ciliophora, Scuticociliatida) as the causative agent of scuticociliatosis in farmed turbot Scophthalmus maximus in Galicia (NW Spain)*. *Diseases Of Aquatic Organisms*, 46, 47-55. <https://doi.org/10.3354/dao046047>
- 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 Immunology*, 47(2), 797-806. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.10.023>
- Jantrakajorn, S., Keawchana, N., Sornying, P., Khirilak, P., & Suyapoh, W. (2024). *Intestinal inflammation, oxidative damage, and pathogenesis of intestinal Cryptosporidium in juvenile Asian sea bass (Lates calcarifer)*. *Journal of The World Aquaculture Society*. <https://doi.org/10.1111/jwas.13114>

- Jia, R., Cao, L., Du, J., He, Q., Gu, Z., Jeney, G., Xu, P., & Yin, G. (2020). *Effects of high-fat diet on antioxidative status, apoptosis and inflammation in liver of tilapia (Oreochromis niloticus) via Nrf2, TLRs and JNK pathways*. *Fish & Shellfish Immunology*, 104, 391-401. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.06.025>
- John, N., Joseph, A., Sasi, A., Mujeeb, B., Baiju, J. E., Syrus, E. C., & Paul, N. M. (2023). *Understanding Vaccine Development in Aquaculture*. En Elumalai, P., Thompson, K., et Lakshmi, S. (Eds.), *Fish vaccines: Health Management for Sustainable Aquaculture*. CRC Press.
- Kelman, Z. (1997). *PCNA: structure, functions and interactions*. *Oncogene*, 14(6), 629-640. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1200886>
- Knutsen, I. S., Erkinharju, T., Bøgwald, J., Dalmo, R. A., & Seternes, T. (2024). *Inflammatory responses in Atlantic lumpfish (Cyclopterus lumpus L.) after intraperitoneal injection of a vaccine against Aeromonas salmonicida and Vibrio salmonicida at different water temperatures*. *Journal of Fish Diseases*, 47(11). <https://doi.org/10.1111/jfd.14001>
- Koppang, E. O., Haugarvoll, E., Hordvik, I., Aune, L., & Poppe, T. T. (2005). *Vaccine-associated granulomatous inflammation and melanin accumulation in Atlantic salmon, Salmo salar L., white muscle*. *Journal of Fish Diseases*, 28(1), 13-22. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2004.00583.x>
- Li, S., Li, J., Peng, W., Hao, G., & Sun, J. (2019). *Characterization of the responses of the caspase 2, 3, 6 and 8 genes to immune challenges and extracellular ATP stimulation in the Japanese flounder (Paralichthys olivaceus)*. *BMC Veterinary Research*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1763-y>
- Long, H., & Sun, L. (2016). *Molecular characterization reveals involvement of four caspases in the antibacterial immunity of tongue sole (Cynoglossus semilaevis)*. *Fish & Shellfish Immunology*, 57, 340-349. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.08.047>
- Losada García, A. P. (2013). *Enteromixosis del rodaballo: esclarecimiento de mecanismos patogénicos y rutas de la respuesta inmunitaria*. Universidade de Santiago de Compostela. Repositorio Institucional.Universidade de Santiago de Compostela.
- Mabrok, M., Algammal, A. M., Sivaramasamy, E., Hetta, H. F., Atwah, B., Alghamdi, S., Fawzy, A., Avendaño-Herrera, R., & Rodkhum, C. (2023). *Tenacibaculosis caused by Tenacibaculum maritimum: Updated knowledge of this marine bacterial fish*

- pathogen*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1068000>
- MAPA (2023). *Producción nacional*. Recuperado de <https://www.mapa.gob.es/es/pesca/temas/acuicultura/produccion-de-acuicultura/produccion-nacional/>
- Mkulo, E. M., Wang, B., Amoah, K., Huang, Y., Jia, C., Jin, X., & Wang, Z. (2024). *The Current Status and Development Forecasts of Vaccines for Aquaculture and its Effects on Bacterial and Viral Diseases*. *Microbial Pathogenesis*, 106971. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.106971>
- Makeesh, M., & Rajendran, KV. (2022). *Fish immune system and vaccines*. Springer Nature.
- Mondal, H., & Thomas, J. (2022). *A review on the recent advances and application of vaccines against fish pathogens in aquaculture*. *Aquaculture International*, 30(4), 1971-2000. <https://doi.org/10.1007/s10499-022-00884-w>
- Moreira, M., Schrama, D., Farinha, A. P., Cerqueira, M., De Magalhães, C. R., Carrilho, R., & Rodrigues, P. (2021). *Fish Pathology Research and Diagnosis in Aquaculture of Farmed Fish; a Proteomics Perspective*. *Animals*, 11(1), 125. <https://doi.org/10.3390/ani11010125>
- 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 Immunology*, 16(5), 633-644. <https://doi.org/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 Immunology*, 38(1), 244-254. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.03.020>
- Núñez-Díaz, J., De la Banda, I. G., Lobo, C., Moriñigo, M., & Balebona, M. (2017). *Transcription of immune related genes in Solea senegalensis vaccinated against Photobacterium damsela subsp. piscicida. Identification of surrogates of protection*. *Fish & Shellfish Immunology*, 66, 455-465. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.05.044>

- Ortego, L. S., Hawkins, W. E., Walker, W. W., Krol, R. M., & Benson, W. H. (1995). *Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in tissues of aquatic animals utilized in toxicity bioassays*. *Marine Environmental Research*, 39(1-4), 271-273. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(94\)00061-s](https://doi.org/10.1016/0141-1136(94)00061-s)
- Piazzon, M., Wiegertjes, G., Leiro, J., & Lamas, J. (2011). *Turbot resistance to *Philasterides dicentrarchi* is more dependent on humoral than on cellular immune responses*. *Fish & Shellfish Immunology*, 30(6), 1339-1347. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.02.026>
- Raja, R. A., & Jithendran, K. P. (2015). *Aquaculture Disease Diagnosis and Health Management. Advances in Marine and Brackishwater Aquaculture*. Springer
- Ramos-Vara, J. A. (2005). *Technical Aspects of Immunohistochemistry*. *Veterinary Pathology*, 42(4), 405-426. <https://doi.org/10.1354/vp.42-4-405>
- Rathor, G. S., & Swain, B. (2024). *Advancements in Fish Vaccination: Current Innovations and Future Horizons in Aquaculture Health Management*. *Applied Sciences*, 14(13), 5672. <https://doi.org/10.3390/app14135672>
- Rigos, G., & Katharios, P. (2009). *Pathological obstacles of newly-introduced fish species in Mediterranean mariculture: a review*. *Reviews In Fish Biology And Fisheries*, 20(1), 47-70. <https://doi.org/10.1007/s11160-009-9120-7>
- Ronza, P., Robledo, D., Losada, A. P., Bermúdez, R., Pardo, B. G., Martínez, P., & Quiroga, M. I. (2020). *The Teleost Thymus in Health and Disease: New Insights from Transcriptomic and Histopathological Analyses of Turbot, *Scophthalmus maximus**. *Biology*, 9(8), 221. <https://doi.org/10.3390/biology9080221>
- Sanden, M., & Olsvik, P. A. (2009). *Intestinal cellular localization of PCNA protein and CYP1A mRNA in Atlantic salmon *Salmo salar* L. exposed to a model toxicant*. *BMC Physiology*, 9(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1472-6793-9-3>
- Santos, P., Peixoto, D., Ferreira, I., Passos, R., Pires, P., Simões, M., Pousão-Ferreira, P., Baptista, T., & Costas, B. (2022). *Short-Term Immune Responses of Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) Juveniles against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida**. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1561. <https://doi.org/10.3390/ijms23031561>
- Seco, F. T. (2002). *Manual de técnicas en histología y anatomía patológica*. Grupo Planeta (GBS).

- Spinos, E., Kokkoris, G. D., & Bakopoulos, V. (2017). *Prevention of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) photobacteriosis and vibriosis. Long term efficacy study of intraperitoneally administered bivalent commercial vaccines*. *Aquaculture*, 471, 172-184. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.01.017>
- Surís-Regueiro, J. C., & Santiago, J. L. (2014). *Characterization of fisheries dependence in Galicia (Spain)*. *Marine Policy*, 47, 99-109. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2014.02.006>
- Suvarna, S. K., Layton, C., & Bancroft, J. D. (2019). *Bancroft's theory and practice of histological techniques*. Elsevier.
- Tafalla, C., Bøgwald, J., & Dalmo, R. A. (2013). *Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: Current knowledge and future perspectives*. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(6), 1740-1750. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.02.029>
- Takle, H., & Andersen, O. (2007). *Caspases and apoptosis in fish*. *Journal of Fish Biology*, 71(sc), 326-349. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01665.x>
- Tammas, I., Bitchava, K., & Gelasakis, A. I. (2024a). *Transforming Aquaculture through Vaccination: A Review on Recent Developments and Milestones*. *Vaccines*, 12(7), 732. <https://doi.org/10.3390/vaccines12070732>
- Tammas, I., Bitchava, K., & Gelasakis, A. I. (2024b). *Advances in Vaccine Adjuvants for Teleost Fish: Implications for Aquatic Welfare and the Potential of Nanoparticle-Based Formulations*. *Vaccines*, 12(12), 1347. <https://doi.org/10.3390/vaccines12121347>
- Torrecillas, S., Caballero, M., Mompel, D., Montero, D., Zamorano, M., Robaina, L., Rivero-Ramírez, F., Karalazos, V., Kaushik, S., & Izquierdo, M. (2017). *Disease resistance and response against *Vibrio anguillarum* intestinal infection in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) fed low fish meal and fish oil diets*. *Fish & Shellfish Immunology*, 67, 302-311. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.06.022>
- Torres-Corral, Y., Girons, A., González-Barreiro, O., Seoane, R., Riaza, A., & Santos, Y. (2021). *Effect of bivalent vaccines against *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas salmonicida* Subspecie *achromogenes* on health and survival of turbot*. *Vaccines*, 9(8), 906. <https://doi.org/10.3390/vaccines9080906>
- Torres-Corral, Y., González-Barreiro, O., Riaza, A., & Santos, Y. (2022). *Establishment of different challenge models for *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* in turbot and sole*. *Aquaculture*, 555, 738261. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738261>



- Valle, L. D. (2022). *Immunohistochemistry and Immunocytochemistry: Methods and Protocols*. Springer.
- Wangkahart, E., Thongsrisuk, A., Vialle, R., Pholchamat, S., Sunthamala, P., Phudkliang, J., Srisapoom, P., Wang, T., & Secombes, C. J. (2023). *Comparative study of the effects of Montanide™ ISA 763A VG and ISA 763B VG adjuvants on the immune response against Streptococcus agalactiae in Nile tilapia (Oreochromis niloticus)*. *Fish & Shellfish Immunology*, 134, 108563. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108563>
- Xu, T., Cui, J., Xu, R., Cao, J., & Guo, M. (2023). *Microplastics induced inflammation and apoptosis via ferroptosis and the NF- $\kappa$ B pathway in carp*. *Aquatic Toxicology*, 262, 106659. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2023.106659>
- Zhang, H., Chen, Y., Cui, J., Yan, X., Sun, Y., & Xu, T. (2022). *PCNA negatively regulates MITA through the autophagy pathway in miyu croaker (Miichthys miyu)*. *Fish & Shellfish Immunology*, 124, 21-27. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.03.035>
- Zhang, J., Ren, H., Zhu, Q., Kong, X., Zhang, F., Wang, C., Wang, Y., Yang, G., & Zhang, F. (2024). *Comparative analysis of the immune responses of CcIgZ3 in mucosal tissues and the co-expression of CcIgZ3 and PCNA in the gills of common carp (Cyprinus carpio L.) in response to TNP-LPS*. *BMC Veterinary Research*, 20 (1). <https://doi.org/10.1186/s12917-023-03854-3>
- Zhao, L., Cui, C., Liu, Q., Sun, J., He, K., Adam, A. A., Luo, J., Li, Z., Wang, Y., & Yang, S. (2020). *Combined exposure to hypoxia and ammonia aggravated biological effects on glucose metabolism, oxidative stress, inflammation and apoptosis in largemouth bass (Micropterus salmoides)*. *Aquatic Toxicology*, 224, 105514. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105514>
- Zamora, L., Fernández-Garayzábal, J. F., Sánchez-Porro, C., Palacios, M. A., Moore, E. R. B., Domínguez, L., Ventosa, A., & Vela, A. I. (2013). *Flavobacterium plurextorum sp. nov. isolated from farmed rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. *PLoS ONE*, 8(6), e67741. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067741>
- Zhou, D., Zhang, B., Qiu, Y., Li, X., & Zhang, J. (2025). *First report and pathogenicity analysis of Photobacterium damsela subsp. piscicida in cage-cultured black rockfish (Sebastes schlegelii) associated with skin ulcers*. *Microorganisms*, 13(2), 441. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13020441>