Universidad Europea MADRID

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Biomedicina

ACTIVACIÓN DIFERENCIAL DE LINFOCITOS B DE TRUCHAS ARCOÍRIS (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) INDUCIDA POR EL ENTRECRUZAMIENTO DEL BCR CON ANTI-IGM CONJUGADO A DEXTRANOS

Autor: **Sebastian Garavito Echeverry**

Villaviciosa de Odón, *Julio 2026*

ACTIVACIÓN DIFERENCIAL DE LINFOCITOS B DE TRUCHAS ARCOÍRIS (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) INDUCIDA POR EL ENTRECRUZAMIENTO DEL BCR CON ANTI-IGM CONJUGADO A DEXTRANOS.

El presente Trabajo de Fin de Grado se ha llevado a cabo en el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA-CSIC), organismo público de investigación integrado en el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) mediante el Real Decreto 202/2021. Con sede central en Madrid, el INIA-CSIC constituye una institución de referencia nacional e internacional en ciencia y tecnología agroalimentaria, forestal y de la bioeconomía, y cuenta actualmente con 34 grupos de investigación, más de 337 proyectos activos y 92 patentes registradas.

La actividad investigadora del centro se organiza en torno a tres Centros de I+D+I y seis departamentos temáticos, entre los que se encuentra el Departamento de Biotecnología, en cuyo seno se ubica el Grupo de Inmunología y Patología de Peces. Este grupo, liderado por la Dra. Carolina Tafalla, investigadora de reconocido prestigio internacional, centra su actividad en el estudio del sistema inmune de peces teleósteos, con especial interés en el desarrollo de vacunas y herramientas de diagnóstico inmunológico frente a patógenos de relevancia en acuicultura. El trabajo experimental descrito en este TFG se desarrolló íntegramente en las instalaciones del grupo, bajo la supervisión de la Dras. Carolina Tafalla y Beatriz Abós.

AGRADECIMIENTOS.

Antes de comenzar con el desarrollo del proyecto me gustaría dedicar unas palabras de agradecimiento a ciertas personas que han sido importantes tanto en mi vida como en el transcurso de los cuatro años de carrera.

Primero de todo me gustaría dar las gracias a mis padres, Catalina y Daniel, por haber hecho todo lo posible para que pudiera estudiar lo que verdaderamente quería y por haberme apoyado incondicionalmente estos cuatro años.

Quiero dar las gracias también a mi hermano, Samuel, por haber aguantado múltiples sermones sobre mis estudios y curiosidades de mi carrera que no le importaban, pero actuaba como que si solo para apoyarme.

A mi novia, Lucía, por haber siempre sido mi punto de apoyo en los buenos y malos momento de estos cuatro años, tanto las épocas de estrés por exámenes como los días eternos en el laboratorio, siempre estaba ahí para alegrarme el día y conseguir que siguiera adelante.

A los amigos que he hecho durante la carrera, en especial Gual, Luke, Iker y Lepe, sin los cuales haber ido a la universidad hubiera sido un infierno y con los cuales he vivido grandes momentos tanto dentro como fuera de la universidad.

A mi tutora Bea, por haberme guiado durante estos cuatro meses de prácticas, haber tenido la paciencia de responder a todas mis dudas y siempre estar dispuesta a ayudarme

A mi directora de prácticas Carolina, por haber confiado en mí y haberme dado la oportunidad de poder haber hecho parte de su grupo de investigación durante estos cuatro meses.

Y, por último, pero no menos importante, a mi profesora de biología del colegio Isabel, por haber inculcado en mí el amor por la biología que hizo que escogiese dedicarme a una carrera de investigación biológica.

RESUMEN. v

1. INTRODUCCIÓN. 1

1.1. Sistema inmunitario en peces. 1

1.2. Linfocitos B en peces teleósteos. 2

1.3. Activación de linfocitos B. 3

1.3.1. Señalización celular y papel del Ca2+. 3

1.3.2. Entrecruzamiento del BCR. 4

1.4. Estrategias experimentales de activación. 5

1.4.1. Uso de Abs anti-Ig. 5

1.4.2. Anti-Ig conjugados a dextranos. 5

1.5. Objetivos de desarrollo sostenible (ODS). 7

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS. 8

3. MATERIALES Y MÉTODOS. 8

3.1. Condiciones experimentales de la trucha arcoíris. 8

3.2. Aislamiento y estimulación de leucocitos. 9

3.3. Flujo de Ca^{2+} con Fluo-3AM. 9

3.4. Proliferación celular. 10

3.5. Ensayos de apoptosis. 10

3.6. Fagocitosis. 11

3.7. Extracción de ARN y síntesis de ADNc. 11

3.8. PCR a tiempo real. 12

3.9. ELISA (Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas). 13

3.10. Análisis estadísticos. 13

4. RESULTADOS. 14

4.1. Activación, proliferación y apoptosis de células B IgM procedentes de sangre de trucha arcoíris estimuladas con distintas dosis de anti-IgM y anti-IgM-Dex. 14

4.2. Efecto de anti-IgM-Dex sobre la activación y proliferación de células B de distintos tejidos de trucha arcoíris. 16

4.3. Efecto de anti-IgM-Dex en la activación y proliferación de células B IgM^+ estimuladas con distintas citoquinas o TNP-LPS. 18

4.4. Efecto de anti-IgM-Dex sobre la fagocitosis de los linfocitos B procedentes de sangre de trucha arcoíris. 20

4.5. Efectos de anti-IgM-Dex en la diferenciación de células B hacia células secretoras de IgM. 20

5. DISCUSIÓN. 21

6. CONCLUSIONES. 26

7. BIBLIOGRAFÍA. 28

RESUMEN.

Los linfocitos B de los peces teleósteos presentan características que los sitúan en un estado evolutivo intermedio entre la inmunidad innata y adaptativa. Su activación mediante el receptor BCR puede estudiarse utilizando anticuerpos (Abs) anti-IgM, aunque la eficacia del estímulo depende del grado de entrecruzamiento del receptor. En mamíferos, los Abs anti-IgM conjugados a dextranos (anti-IgM-Dex) inducen una activación significativamente superior al anti-IgM convencional, pero esta estrategia no había sido evaluada previamente en teleósteos.

En este trabajo se analizó el efecto de anti-IgM-Dex sobre linfocitos B IgM^+ de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) procedentes de sangre mediante ensayos de flujo de Ca^{2+}, proliferación, apoptosis, fagocitosis, ELISA y PCR a tiempo real. Los resultados mostraron que anti-IgM-Dex indujo una mayor activación del BCR que el anti-IgM sólo, reflejada por un aumento significativo del flujo de Ca^{2+} y de la proliferación celular en células B de sangre, con efectos diferenciales en leucocitos de bazo y riñón. Además, los porcentajes de apoptosis con anti-IgM-Dex fueron menores respecto a la estimulación con anti-IgM sin conjugar y se observó un incremento del número de células fagocíticas. Sin embargo, no hubo sinergia en la activación/proliferación inducida por anti-IgM-Dex con distintas citoquinas activadoras de células B (APRIL, BAFF, IL-21) o el estímulo TNP-LPS. Tampoco se observaron cambios en la expresión de genes relacionados con la diferenciación a células plasmáticas. En conjunto, los resultados establecen el anti-IgM-Dex como una herramienta útil para el estudio de la activación diferencial de linfocitos B y en el desarrollo de estrategias vacunales en peces teleósteos.

Palabras clave: Linfocitos B; inmunidad adaptativa; receptor de células B (BCR); anti-IgM-Dex; trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*); proliferación celular; señalización intracelular; peces teleósteos

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Sistema inmunitario en peces.

El sistema inmunitario de los peces teleósteos está formado por mecanismos de inmunidad innata y adaptativa capaces de proteger al organismo frente a patógenos del medio acuático. La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa y engloba barreras físicas como la piel, las branquias y el intestino, además de células fagocíticas y receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), entre ellos los *Toll-like receptors* (TLRs), que permiten detectar microorganismos y desencadenar respuestas inflamatorias (Salinas, 2015; Zapata & Amemiya, 2000).

La inmunidad adaptativa en peces presenta componentes homólogos a los de mamíferos, incluyendo linfocitos T y B. Los linfocitos B participan en la respuesta humoral mediante la producción de inmunoglobulinas (Ig) y la diferenciación a células plasmáticas. En teleósteos se han identificado principalmente tres isotipos de Igs: IgM, IgD e IgT/IgZ, siendo la IgM la más abundante en sangre y la IgT especialmente relevante en tejidos mucosos (Fillatreau et al., 2013; Zhang et al., 2010). La activación de los linfocitos B se produce tras el reconocimiento antigénico a través del BCR, induciendo proliferación celular y señalización intracelular, incluyendo movilización de Ca^{2+} (Granja et al., 2019). Además, los linfocitos B de peces presentan propiedades innatas como capacidad fagocítica y respuesta directa frente a PAMPs, lo que evidencia una estrecha relación entre inmunidad innata y adaptativa (Sunyer, 2013).

El sistema inmunitario de los peces presenta importantes diferencias respecto al de los mamíferos. Una de las más destacadas es la ausencia de médula ósea y ganglios linfáticos. En su lugar, el riñón cefálico actúa como principal órgano hematopoyético y linfoide, siendo el lugar de desarrollo y maduración de linfocitos B (Zapata & Amemiya, 2000; Zwollo et al., 2005). El bazo constituye el principal órgano linfoide secundario implicado en la filtración sanguínea y en la respuesta inmunitaria adaptativa. Otra diferencia relevante es la organización difusa del tejido linfoide asociado a mucosas (MALT), presente en intestino, piel, branquias y cavidad nasal, pero sin estructuras organizadas equivalentes a las placas de Peyer de mamíferos (Salinas & Miller, 2015). Asimismo, los peces presentan una menor eficiencia en procesos de maduración por afinidad y memoria

inmunológica, aunque poseen mecanismos de hipermutación somática mediados por AID (*activation-induced cytidine deaminase*) (Ye et al., 2013).

1.2. Linfocitos B en peces teleósteos.

Los linfocitos B median las respuestas inmunitarias adaptativas humorales mediante el reconocimiento antigénico a través del BCR, complejo formado por una Ig asociada a las cadenas CD79α y CD79β, y la producción de Abs específicos. Además de secretar Abs, participan en la presentación antigénica mediante MHC II, lo cual favorece la activación de linfocitos T colaboradores (Rodríguez-Pinto, 2005). A diferencia de los mamíferos, los linfocitos B de los teleósteos presentan una notable capacidad fagocítica y funciones microbicidas, actuando como células presentadoras de antígeno de alta eficiencia (Zhang et al., 2017). Además, presentan numerosas similitudes funcionales y fenotípicas con las células B1 de mamíferos, incluyendo alta expresión de IgM, baja expresión de IgD y presencia de receptores innatos (Abós et al., 2013). En conjunto, estas características apoyan la hipótesis de que los linfocitos B de teleósteos representan un estado evolutivo intermedio entre la inmunidad innata y adaptativa (Sunyer, 2012).

En peces teleósteos, ante la ausencia de médula ósea, los linfocitos B se originan y maduran en el riñón cefálico, donde en trucha arcoíris se ha demostrado la expresión de genes implicados en la diferenciación y recombinación linfocitaria como RAG-1/2, TdT e Ikaros, así como la presencia de linfocitos en distintos estadios de maduración (Zwollo et al., 2005, 2010). Una vez madurados, los linfocitos B migran a órganos linfoides secundarios donde, tras el reconocimiento antigénicos a través del BCR y señales coestimuladoras, proliferan y se diferencian a células plasmáticas o células de memoria (Lanzavecchia, 1985).

En trucha arcoíris, citoquinas como la interleuquina 2 (IL-2), IL-4/13B, IL-10 e IL-21, así como moléculas de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) como BAFF (B cell Activating Factor) y APRIL (A Proliferation-Inducing Ligand), regulan la supervivencia, proliferación y secreción de IgM de los linfocitos B en la respuesta inmune (Abos et al., 2020; Tafalla et al., 2017). Aunque la maduración de la afinidad es menos eficiente que en mamíferos, existen mecanismos de diferenciación hacia células plasmáticas en teleósteos (Zwollo, 2011). Además, los linfocitos B de peces presentan

una elevada sensibilidad frente a estímulos innatos a través de TLRs, respondiendo intensamente a LPS o CpGs (Abós et al., 2016), lo que sugiere que su activación depende de señales tanto adaptativas como innatas.

En peces teleósteos se han identificado diferentes subpoblaciones de linfocitos B definidas por el patrón de expresión de Igs de membrana. La células B maduras $IgM^{+}IgD^{+}$ constituyen la población principal en sangre periférica y tejidos linfoides, representando linfocitos B naïve que, tras la activación antigénica, pierden la expresión superficial de IgD y se diferencian hacia un fenotipo $IgM^{+}IgD^{-}$ con características de plasmablasto (Granja & Tafalla, 2019; Simón et al., 2019). Asimismo, se han descrito células $IgD^{+}IgM^{-}$ en sangre de pez gato y en tejidos mucosos de trucha arcoíris, especialmente en branquias e intestino, relacionadas con la homeostasis de la mucosa y la regulación de la microbiota intestinal a través de la secreción de IgD (Castro et al., 2014; Perdiguero et al., 2019). En mamíferos, IgM es una molécula pentamérica, mientras que en los teleósteos toma una forma tetramérica. A pesar de esta diferencia estructural, la IgM de los teleósteos conserva funciones análogas a las de los mamíferos, como la activación del complemento y la mediación de la citotoxicidad celular, aunque con algunas diferencias en cuanto a la eficiencia funcional (Abós et al., 2016).

Por otro lado, los linfocitos B IgT^{+} constituyen una línea celular independiente que expresa exclusivamente IgT en superficie, se encuentra enriquecida en tejidos mucosos y desempeña funciones especializadas en la defensa frente a patógenos en intestino, piel y branquias (Xu et al., 2016; Y.-A. Zhang et al., 2010). En conjunto, esta diversidad de subpoblaciones evidencia que los linfocitos B de teleósteos combinan características de la inmunidad adaptativa e innata con funciones diferenciadas según el tejido de residencia.

1.3. Activación de linfocitos B.

1.3.1. Señalización celular y papel del Ca2+.

Tras el reconocimiento antigénico por el BCR, se desencadena una cascada de señalización intracelular altamente conservada. La activación de la quinasa Syk conduce a la fosforilación de BLNK y la formación de un complejo con PLCγ2, Grb2 y Btk que hidroliza PIP2 generando los segundos mensajeros DAG e IP3. Este último provoca la

liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico, cuya reducción activa a su vez los canales CRAC (*Calcium Release-Activated Calcium channels*) en la membrana plasmática permitiendo la entrada de Ca^{2+} extracelular mediante el proceso denominado SOCE (*Store-Operated Calcium Entry*) (Wen et al., 2019).

El Ca^{2+} así movilizado actúa como segundo mensajero central que determina el destino de la célula B, afectando a la señalización por quinasas, la fisiología mitocondrial, la apoptosis y el tráfico nucleocitoplasmático de factores de transcripción como NFAT y NF-κB (Scharenberg et al., 2007). Señales débiles del BCR inducen apoptosis al no activar suficientemente la expresión génica antiapoptótica dependiente de NF-κB, mientras que señales más intensas promueven la supervivencia y entrada en ciclo celular dependientes de NF-κB, NFAT, mTORC1 y c-Myc (Berry et al., 2020), lo que convierte el flujo de Ca^{2+} intracelular en un indicador directo y cuantificable del grado de activación de los linfocitos B.

1.3.2. Entrecruzamiento del BCR.

El entrecruzamiento o *crosslinking* del BCR hace referencia al proceso por el cual la unión de antígenos multivalentes induce la agrupación de múltiples complejos BCR en la membrana plasmática, constituyendo el evento iniciador de la activación de los linfocitos B. Dicha agrupación induce la fosforilación de los motivos ITAM de las proteínas señalizadoras Igα e Igβ, catalizada por quinasas de la familia Src como Lyn, que recluta a la quinasa Syk esencial para la propagación de la señal (Courtney et al., 2009). La multivalencia del antígeno es determinante en la intensidad de la señal generada: los antígenos polivalentes agrupan los complejos BCR acercando los componentes de señalización lo suficiente para activarlos, algo que los fragmentos Fab monovalentes son incapaces de lograr (Westbroek & Geahlen, 2017).

La ligación multivalente del BCR permite además que la quinasa Syk compense la ausencia de quinasas de la familia Src mediante mecanismos de retroalimentación positiva, mientras que ante ligandos monovalentes ambas familias son necesarias para una activación completa (Mukherjee et al., 2013). La intensidad del entrecruzamiento no sólo determina la magnitud de la señal sino también sus consecuencias funcionales, ya que dosis bajas de anti-IgM pueden reducir la supervivencia de los linfocitos B primarios,

siendo necesaria la ocupación de la mayoría de los BCR de superficie para que se produzca una mejora en la supervivencia celular (Yasuda et al., 2017).

1.4. Estrategias experimentales de activación.

1.4.1. Uso de Abs anti-Ig.

Los Abs anti-IgM $F(ab')_2$, que conservan los dos brazos de unión al antígeno unidos entre sí, se utilizan tanto *in vitro* como *in vivo* para activar linfocitos B mediante el entrecruzamiento de las moléculas de IgM de superficie, mimetizando la señalización del BCR tras la unión del antígeno e induciendo síntesis de ADN, proliferación y apoptosis, pero sin involucrar receptores Fc (Fleige & Capellino, 2024). Su fundamento reside en que la unión del Ab anti-Ig a la IgM de membrana provoca el entrecruzamiento artificial del BCR, mimetizando de forma policlonal la señal que en condiciones fisiológicas generaría el reconocimiento de un antígeno específico, lo que permite estudiar las consecuencias funcionales de la señalización por BCR – movilización de Ca^{2+}, proliferación, apoptosis – sin necesidad de un antígeno específico.

El primer estudio que demostró la proliferación de linfocitos B de teleósteos en respuesta al entrecruzamiento de la IgM de membrana fue realizado en pez gato, describiendo un rápido incremento en el Ca^{2+} intracelular y una fosforilación en residuos de tirosina análogos a los observados en mamíferos, lo que sugirió un sistema de transducción de señal conservado evolutivamente (Van Ginkel et al., 1994). Esto fue posteriormente confirmado al demostrarse que el entrecruzamiento del BCR en teleósteos desencadena tanto la entrada de Ca^{2+} intracelular como la activación de PKC, componentes característicos de la vía del fosfatidilinositol en linfocitos de mamíferos. En trucha arcoíris, el anti-IgM se ha consolidado como el estímulo de referencia para evaluar la activación de linfocitos B IgM^+, siendo ampliamente utilizado para medir flujo de calcio, proliferación y otros parámetros funcionales en células de distintos tejidos (Perdiguero et al., 2021).

1.4.2. Anti-Ig conjugados a dextranos.

El grado de activación de los linfocitos B depende, en gran medida, del grado de entrecruzamiento de sus BCR de membrana, el cual está determinado a su vez por la valencia del estímulo antigénico. En este sentido los conjugados multivalentes

convencionales pueden resultar problemáticos, ya que tienden a formar agregados o moléculas insolubles que dificultan su manejo experimental y limitan su utilidad en ensayos de activación celular (Brunswick et al., 1988). Con el objetivo de superar estas limitaciones, se desarrolló un modelo basado en la conjugación de anti-Igs a dextranos de alto peso molecular, una estrategia que incrementa de forma notable la valencia efectiva del estímulo y favorece un entrecruzamiento más eficiente del BCR. Este sistema ha demostrado ser especialmente eficaz para inducir activación funcional de los linfocitos B, hasta el punto de provocar una mayor proliferación y una mayor expresión de MHC II en células B murinas a concentraciones hasta 1000 veces inferiores a las requeridas por los anti-Igs no conjugados (Brunswick et al., 1988).

De forma complementaria, este tipo de aproximación también ha demostrado una gran eficacia en células B humanas. En concreto, el anti-IgM conjugado a dextrano ha sido descrito como entre 100 y 1000 veces más potente que el anti-IgM libre para inducir fenómenos tempranos de activación, como el aumento del tamaño celular y la elevación de Ca^{2+} intracelular, además de potenciar de forma marcada la proliferación de estas células. Esta activación puede producirse incluso a concentraciones en las que no se observa una modulación apreciable de la Ig de superficie, lo que refuerza la idea de que la conjugación con dextrano permite optimizar notablemente la eficacia del estímulo sobre el BCR (Rehe et al., 1990). En conjunto, estos resultados ponen de manifiesto que la unión de Abs a dextrano no solo actúa como una simple modificación estructural, sin que constituye una estrategia funcionalmente relevante para amplificar la señal de activación en linfocitos B de mamíferos.

Además de su uso como herramienta para estudiar la activación de células B, los conjugados anti-Ig-dextrano se han empleado como modelo experimental de antígenos T-independientes tipo 2, (caracterizados por tener estructuras repetitivas), especialmente por su utilidad para analizar procesos de proliferación y secreción de Ig en ausencia de ayuda de linfocitos T (Peçanha et al., 1991; Snapper et al., 1993). En modelos murinos, este sistema ha permitido estudiar con detalle la regulación de la respuesta humoral, así como la participación de distintos factores solubles en la diferenciación y secreción de Abs por parte de los linfocitos B. En este contexto, el dextrano se consolida como una

plataforma experimental particularmente útil para incrementar la multivalencia de los Abs y reproducir estímulos de activación más potentes y fisiológicamente relevantes (Brunswick et al., 1988; Peçanha et al., 1993). A pesar de ello, esta línea de investigación ha sido relativamente poco explotada y, hasta donde alcanza la literatura disponible, casi no se ha trasladado al estudio de modelos de peces teleósteos.

Más allá de la biología de linfocitos B, la utilidad de los conjugados ligando-dextrano ha quedado demostrada en inmunoterapia antitumoral. La conjugación del oligonucleótido CpG a dextrano de 70 kDa redirigió su distribución hacia el sistema linfático, favoreciendo su acumulación en ganglios linfáticos drenantes y su captación por células presentadoras de antígeno, sin comprometer su capacidad de activar NF-κB vía TLR9. Funcionalmente, la formulación potenció las respuestas de linfocitos T $CD8^+$ citotóxicos e indujo memoria inmunológica de larga duración en modelos murinos (W. Zhang et al., 2017). Estos hallazgos refuerzan la idea de que la conjugación a dextrano constituye una plataforma versátil para mejorar la eficacia funcional de diversas moléculas de reconocimiento inmunológico. Con base en este potencial, el presente trabajo estudió el efecto de Abs anti-IgM conjugados a dextrano sobre la activación de células B de trucha arcoíris en un modelo in vitro.

1.5. Objetivos de desarrollo sostenible (ODS).

El presente trabajo se alinea con varios Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Agenda 2030. En relación con el ODS 2 (Hambre cero), el conocimiento generado sobre la activación del sistema inmune de la trucha arcoíris contribuye al desarrollo de estrategias vacunales más eficaces en acuicultura. Respecto al ODS 9 (Industria, innovación e infraestructura), este estudio emplea metodologías de vanguardia como el uso de conjugados dextrano-Ab, contribuyendo al avance científico y tecnológico en inmunología de peces. Finalmente, en línea con el ODS 14 (Vida submarina), la comprensión de los mecanismos inmunitarios de los teleósteos es fundamental para el desarrollo de herramientas que mejoren la salud de las poblaciones de peces, contribuyendo así a la conservación y uso sostenible de los recursos marinos y de agua dulce.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

Se propone como hipótesis que el Ab anti-IgM conjugado a dextranos inducirá una activación diferencial y dosis-dependiente de linfocitos B de *Oncorhynchus mykiss*, superior a la obtenida mediante anti-IgM no conjugado.

El objetivo principal de la investigación es evaluar el efecto del entrecruzamiento del receptor de células B (BCR) mediante el Ab anti-IgM conjugado a dextranos (anti-IgM-Dex) comparado con el mismo Ab anti-IgM no conjugado, sobre la activación y funcionalidad de los linfocitos B de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Y los objetivos específicos son:

- Analizar la activación de los linfocitos B tras la estimulación con anti-IgM y anti-IgM-Dex mediante la evaluación del flujo de $Ca2^{+}$ intracelular.
- Comparar el efecto de anti-IgM y anti-IgM-Dex sobre la proliferación de los linfocitos B.
- Evaluar el impacto del entrecruzamiento del BCR sobre los procesos apoptóticos y la viabilidad celular de los linfocitos B tras estimulación con anti-IgM-Dex o anti-IgM sin conjugar.
- Estudiar la influencia de señales coestimuladoras, como IL-21, BAFF, APRIL y TNP-LPS, sobre la activación y proliferación inducida por anti-IgM-Dex.
- Determinar si la activación mediante anti-IgM-Dex modifica la capacidad fagocítica de los linfocitos B de peces.
- Determinar la diferenciación a células secretoras de Abs tras estimulación con anti-IgM-Dex o anti-IgM sin conjugar, así como la expresión génica de distintos genes inmunes en linfocitos B.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Condiciones experimentales de la trucha arcoíris.

Se utilizaron ejemplares de trucha arcoíris (*O. mykiss*) mantenidos en instalaciones del INIA apropiadas a 15ºC, con un sistema de recirculación de agua, aireación continua y un fotoperiodo de 12 h de luz/12 h de oscuridad. Los peces fueron alimentados dos veces al día con una dieta comercial (Skretting Stavanger). Antes de realizar ningún

procedimiento experimental, los peces se aclimataron a estas condiciones durante 15 días y durante este tiempo fueron supervisados diariamente para confirmar la ausencia de signos clínicos de enfermedad y para controlar los parámetros de calidad del agua.

Todos los experimentos descritos cumplen con las directrices del consejo de la Unión Europea (2012/63/EU) y el Real Decreto, RD 53/2013 para el uso de animales de laboratorio y, además, han sido aprobados por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) (PROEX 065.3/21).

3.2. Aislamiento y estimulación de leucocitos.

Los peces fueron anestesiados y sacrificados mediante sobredosis de benzocaína (Sigma-Aldrich). La sangre se obtuvo por punción con aguja heparinizada y el bazo y riñón se aislaron mediante disección estéril. Todas las muestras se recogieron en medio Leibovitz L-15 (Thermo Fisher Scientific) suplementado con 1% P/S y 2% FBS. Los tejidos se homogenizaron mediante filtración a través de filtros celulares de 100 µm y las suspensiones celulares se sometieron a separación leucocitaria mediante gradiente discontinuo de Percoll (30%/51%). Tras la centrifugación, la fracción leucocitaria se recuperó, se lavó y se resuspendió en L-15 suplementado con 1% P/S y 5% FBS. La concentración celular se determinó mediante exclusión con Azul Tripán utilizando una cámara Fast-Read 102®, ajustándose posteriormente a 2×10^6 células/mL.

La estimulación celular se realizó con un anticuerpo monoclonal anti-IgM de trucha arcoíris (clon 1.14) o con su forma conjugada a dextranos (Fina Biosolutions LLC), empleando concentraciones de 0.1, 0.5 o 1 µg/mL según el ensayo. En determinados experimentos, las células se coestimularon con IL-21 recombinante (200 ng/mL), BAFF recombinante (3 µg/mL), APRIL recombinante (1 µg/mL) o TNP-LPS (5 µg/mL). Las células se incubaron durante periodos variables según el experimento, incluyendo siempre controles no estimulados.

3.3. Flujo de Ca^{2+} con Fluo-3AM.

El flujo de Ca^{2+} intracelular se analizó en leucocitos aislados de sangre, bazo o riñón, según el experimento, utilizando el indicador fluorescente Fluo-3AM (Life Technologies). Para ello, aproximadamente 2×10^6 células se incubaron con Fluo-3AM

diluido en L-15 sin suero, a una concentración final de 5 µg/mL durante 60 min a Tª ambiente en oscuridad. Tras la incubación las células se lavaron y se adquirieron mediante citometría de flujo (FACS Celesta™ BD Biosciences) durante 1 min para obtener los niveles basales y después, se añadió al tubo correspondiente anti-IgM o bien anti-IgM-Dex a distintas concentraciones (0.1, 0.5 o 1 µg/mL) continuando con el registro hasta llegar a los 5 min totales. Los datos de citometría de flujo se analizaron usando el software FlowJo v.10 (FlowJo LLC, Tree Star). En todos los casos la viabilidad celular se evaluó mediante diclorhidrato de 4',6-diamidino-2'-fenilindol (DAPI, Sigma-Aldrich) a una concentración de 0.2 µg/mL.

3.4.Proliferación celular.

Para analizar la capacidad de proliferación de los linfocitos B de sangre, bazo o riñón estimulados en ausencia o presencia de anti-IgM o anti-IgM-Dex a distintas concentraciones, se realizaron ensayos de proliferación por citometría de flujo con el kit Click-iT EdU Alexa Fluor 488 (Life Technologies). Los leucocitos se cultivaron a una concentración de 2×10^6 células/ml en placas de 96 pocillos en medio L-15 suplementado con 5% de FBS y P/S y se estimularon con anti-IgM o anti-IgM-Dex a las concentraciones indicadas en cada experimento durante 72 h. En algunos experimentos las células fueron co-estimuladas con IL-21, APRIL o TNP-LPS junto con anti-IgM o anti-IgM-Dex. Siempre se incluyeron controles sin estimular o con los estímulos solos. Tras 48 h de incubación a 20ºC se añadió 5-etinil-2´-deoxiuridina (EdU) a una concentración final de 1 µM y las células se incubaron durante 24 h adicionales. Posteriormente, la incorporación de EdU al ADN se determinó siguiendo las instrucciones del kit. Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo, como se ha descrito anteriormente.

3.5.Ensayos de apoptosis.

El análisis de apoptosis se realizó mediante tinción con Anexina V (Sigma Aldrich) y DAPI en leucocitos previamente estimulados con anti-IgM o anti-IgM-Dex durante los tiempos y concentraciones indicados en cada experimento. Para ello, entre 1–5 × 10^5 leucocitos por condición se centrifugaron a 300–400 × *g* durante 5 min a 4ºC y posteriormente se lavaron una vez con PBS frío. A continuación, las células se resuspendieron en 100 µL de Annexin V Binding Buffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl

y 2.5 mM CaCl2, pH 7.4) y se incubaron con 5 µL de Anexina V conjugada a PE (ficoeritrina) durante 15 min a Tª ambiente y en oscuridad. Tras la incubación, se añadieron 400 µL adicionales de Binding Buffer y DAPI a una concentración final de 1 µg/mL para evaluar la viabilidad celular, y las muestras se adquirieron por citometría de flujo. Las poblaciones celulares se clasificaron como células viables (Anexina V^-/$DAPI^-$), células en apoptosis temprana (Anexina V^+/$DAPI^-$), células en apoptosis tardía (Anexina V^+/$DAPI^+$) o células necróticas (Anexina V^-/$DAPI^+$).

3.6.Fagocitosis.

La capacidad fagocítica de los leucocitos de sangre estimulados o sin estimular con anti-IgM o anti-IgM-Dex a 1 µg/mL durante 24 h, se evaluó mediante citometría de flujo utilizando microesferas fluorescentes (FluoSpheres® Microspheres, Crimson Red Fluorescent, Life Technologies). Tras el periodo de estimulación las microesferas se diluyeron en L-15 sin suero hasta una concentración final de 4×10^6 por pocillo en una placa de 96 pocillos (100 µL/pocillo) y se centrifugaron a 500 × g durante 3 min para favorecer su sedimentación. A continuación, se añadieron las células (4 × 105 por pocillo) diluidas también en L-15 sin suero, de forma que la ratio célula:esfera fue de 1:10, y se incubaron durante 3 h a 20ºC. Tras la incubación, las células se recogieron y se resuspendieron en 300 µL de medio L-15 sin suero. La suspensión resultante se depositó cuidadosamente sobre tubos con un colchón de 1.2 mL de PBS-BSA-Glucosa (PBS suplementado con 3% BSA y 4,5% D-Glucosa), evitando su mezcla, y se centrifugó a 100 × g durante 10 min. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió en 200 µL de Staining Buffer (SB), medio L-15 sin rojo fenol al 2% de FBS, para su posterior adquisición por citometría de flujo.

3.7.Extracción de ARN y síntesis de ADNc.

El ARN total de los leucocitos de sangre estimulados y sin estimular se extrajo utilizando TRI-Reagent (ThermoFisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Aproximadamente 2×10^6 células se centrifugaron a 300 × *g* durante 5 min a 4ºC y el pellet celular se homogenizó en 1 mL de TRI-Reagent. Tras la lisis celular se añadieron 200 µL de cloroformo y las muestras se centrifugaron a 15 700 × *g* durante 15 min a 4ºC. La fase acuosa se recuperó y el ARN se precipitó con isopropanol suplementado con *Glycoblue*™ (ThermoFisher Scientific) a 1:500. Las muestras se incubaron a -80ºC

durante la noche para favorecer la precipitación del ARN. Posteriormente el ARN se centrifugó, se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en agua libre de DNasas. La concentración y pureza se determinaron mediante espectrofotometría con el NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific).

La síntesis de ADNc (ADN complementario) se realizó con el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific). Entre 0.5 y 1 µg de ARN total se trataron con DNasa I durante 30 min a 37ºC para eliminar contaminaciones de ADN genómico. Posteriormente se realizó la retrotranscripción con oligo(dT) (3,2 ul a 10 µM) incubándose a 70ºC durante 2 min y enfriándose en hielo. A continuación, se añadieron 7 ul de mezcla de reacción (4 µl de tampón 5X, 2 µl de dNTPs 10 mM, 1 µl de transcriptasa reversa a 200 U/µl). Las muestras se incubaron a 42ºC durante 60 min, 45ºC durante 30 min, 50ºC durante 30 min y finalmente a 90ºC durante 5 min para inactivar la enzima. El ADNc obtenido se almacenó a -20ºC hasta su uso.

3.8.PCR a tiempo real.

La expresión génica se analizó mediante PCR cuantitativa a tiempo real utilizando como método de detección SYBR Green y con el uso del termociclador LightCycler 96® (Roche). Las reacciones se realizaron en placas opacas de 96 pocillos con un volumen final de 10 µL que contenía 2 µl de ADNc, 5 µl de SYBR Green Mix Reaction, 0,6 µl de mezcla de cebadores (10 µM) y 2,4 µl de agua libre de nucleasas.

Los genes analizados fueron: *prdm1-a1, prdm1-a2, prdm1-c1, prdm1-c2, pax5, bcma, irf4, igm secretada, ccr7a, ccr7b, ccr9a, ccr9b, cxcr3a, cxcr3b y cxcr4*. El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 2 min seguida de 40 ciclos de 95ºC durante 15 s y 60ºC durante 30 s. Al final del programa se realizó una curva de disociación para verificar la especificidad de la amplificación. La cuantificación relativa de la expresión génica se calculó mediante el método $2^{-\Delta Ct}$ utilizando la *β-actina* como gen de referencia constitutivo. La secuencia de todos los cebadores se incluye en la Tabla 1.

Tabla 1. *Primers* utilizados para la qPCR.

Gen	Forward primer	Reverse primer
b-actina	TCCTTCCTCGGTATGGAGTCT	TTACGGATGTCCACGTCACAC
prdma1-a1	CAGCGCCCCAGTCAAGATA	GGGGGTAGAGGGCACAGC
prdma1-a2	CATTCGGCCCTATGTGTGG	CCCCTCGGTAGTCAACATGG
prdma1-c1	TCACTGCATCAACACCGAGA	CCGGTCTCCATCACCATCTT
prdma1-c2	CGCCAATGGGAATATGTCA	GACATAGCCAGGATGCAGA
irf4	CGCATCACCATAGCAACACC	CTCCTCTCCCCAGGCTTTCT
bcma	ATGTCAGAAGGACAGTGTGGACTGG	CGGCTCTGGGGCTTTGCTCT
pax5	ACGGAGATCGGATGTTCCTCTG	GATGCCGCGCTGTAGTAGTAC
ck5b	TTTGCTGATCGTCAGATACCC	GTGTCTGCTCCCCAGACTTC
ccr7a	TTCACTGATTACCCCACAGACAATA	CAGACCGAGGAAGCAGATGAG
ccr7b	AATGGTTACTCCACAGACACGAAC	CAGACCGAGGAAGCAGATGAG
ccr9a	TCAATCCCTTCCTGTATGTGTTTGT	GTCCGTGTCTGACATAACTGAGGAG
ccr9b	AATATTTCCAACGTCTGAAACAGGA	CTCACCCAGGACTTATCACACATTC
cxcr3a	CAAGGCAACCACAAATTACTATATTTATGATG	CAGCACACACAGCACCAGGAT
cxcr3b	CACTGGAGCCATGTTTACAATCAACT	CCCTCACAGACTCCAGGAAGTG
cxcr4	ACACCCTAATGTTGCTCAATGTGAT	AGACAGCAATGAAAGTATGCCAGAG

3.9. ELISA (Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas).

Para cuantificar los niveles de IgM secretada, leucocitos de sangre se incubaron con anti-IgM o anti-IgM-Dex durante 3 h a 20ºC, se lavaron tres veces con L-15 para eliminar restos de anticuerpo y se cultivaron 48 h adicionales para la recogida de sobrenadantes. El ELISA se realizó en placas de 96 pocillos (Nunc MaxiSorp™, Thermo Fisher) recubiertas con anti-IgM de trucha (clon 1.14, 2 µg/mL en tampón carbonato) overnight a 4ºC. Tras bloqueo con PBS-T + 1% BSA (1 h, Tª ambiente), se añadieron los sobrenadantes por duplicado (dilución 1:10) y se incubaron 1 h. Posteriormente se incubó con anti-IgM biotinilado (1 µg/mL, 1 h) seguido de estreptavidina-HRP (100 ng/mL, 1 h). El revelado se realizó con sustrato OPD (Sigma-Aldrich) en buffer citrato con 0,03% H_2O_2, deteniéndose la reacción con H_2SO_4 2,5 M. La absorbancia se midió a 490 nm en un lector FLUO Star Omega (BMG Labtech).

3.10. Análisis estadísticos.

El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad Prism 8 y Microsoft Office Excel. Estos se expresaron como media + error estándar de la media (SEM). Se analizó la normalidad de los datos con el test de Shapiro-Wilk y aquellos que no siguieron una normalidad Gaussiana se transformaron para poder realizar los análisis estadísticos. Las

diferencias entre grupos se evaluaron mediante las pruebas estadísticas apropiadas (por ejemplo, *t* de Student o ANOVA para distribuciones paramétricas de datos y Mann-Whitney U o Kruskal Wallis para distribuciones no paramétricas), considerándose significativos valores de $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$ y $***p \leq 0.001$.

4. RESULTADOS.

4.1. Activación, proliferación y apoptosis de células B IgM procedentes de sangre de trucha arcoíris estimuladas con distintas dosis de anti-IgM y anti-IgM-Dex.

Para caracterizar el efecto del Ab anti-IgM conjugado a dextranos en la activación y proliferación de células B se utilizaron distintas dosis (0.1, 0.5 y 1 µg/mL) tanto del Ab anti-IgM como del anti-IgM-Dex.

La activación de células B IgM$^+$ se evaluó mediante flujo de calcio, incubando leucocitos de sangre con Fluo-3AM y analizando las curvas por citometría de flujo (1 min basal + 4 min post-estímulo). Para todas las concentraciones evaluadas, anti-IgM-Dex indujo una mayor señal de Ca^{2+} que anti-IgM, tanto en la fase de activación (marker 1) como en la de meseta (marker 2), con valores de Fluo-3 MFI significativamente superiores en ambas fases (Fig. 1). Asimismo, el porcentaje de células Ca^{2+} positivas aumentó significativamente con anti-IgM-Dex a las concentraciones de 0.1 y 0.5 µg/mL. En conjunto, estos resultados indican que la estimulación con anti-IgM-Dex induce un aumento significativo del fujo de Ca^{2+} y del porcentaje de linfocitos B Ca^{2+} positivos, respecto al Ab anti-IgM no conjugado.

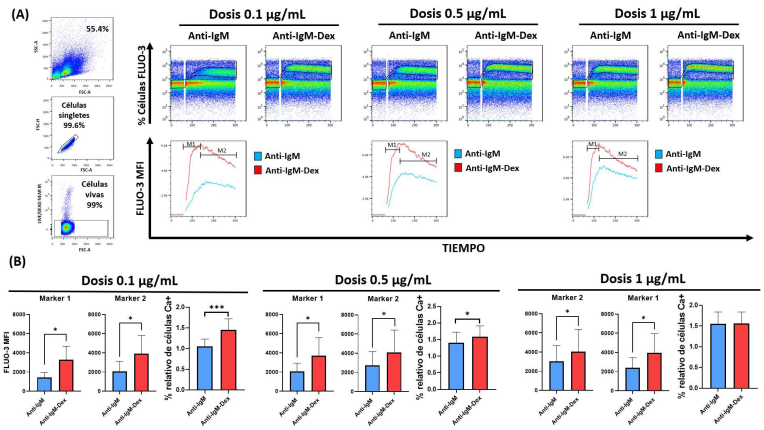

Figura 1. *Efecto de anti-IgM y anti-IgM-Dex en la activación de linfocitos B de trucha arcoíris evaluada mediante flujo de Ca^{2+}.* (A) *Dot plots* y curvas representativas del flujo de Ca^{2+} intracelular determinadas

mediante la fluctuación en la señal de Fluo-3AM tras la estimulación con anti-IgM y anti-IgM-Dex a diferentes concentraciones (0.1, 0.5 y 1 µg/mL). (B) Gráficos mostrando las medias de MFI de Fluo-3AM + SEM (n=6) en la fase inicial (marker 1) y en la fase de meseta (marker 2) y medias del porcentaje relativo de células que aumentan el Ca^{2+} para cada dosis experimental. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las distintas condiciones. *$p \leq 0.05$.

Para el análisis de proliferación de células B IgM^+, se estimularon los leucocitos de sangre con las distintas concentraciones de anti-IgM y anti-IgM-Dex (0.1, 0.5 y 1 µg/mL) durante 72 h en condiciones estándar de cultivo (20ºC) y se añadió EdU, 24 h antes del análisis por citometría de flujo. Los resultados mostraron un aumento significativo en el porcentaje de células EdU positivas en las muestras estimuladas con anti-IgM-Dex en comparación con el control y con anti-IgM, para cada una de las concentraciones analizadas (Fig. 2). Además, no se observaron diferencias relevantes entre las distintas concentraciones de anti-IgM-Dex, manteniéndose niveles similares de proliferación en todas ellas. En conjunto, estos resultados indican que la estimulación con anti-IgM-Dex induce un aumento significativo de la proliferación de linfocitos B, mientras que el anti-IgM no conjugado no produce un efecto apreciable.

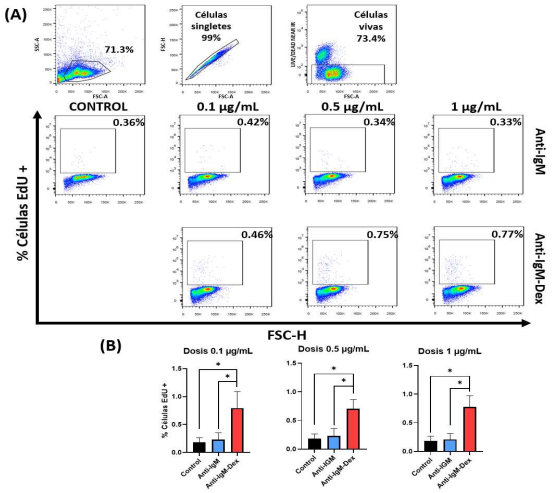

Figura 2. *Efecto de anti-IgM y anti-IgM-Dex en la proliferación de linfocitos B IgM^+ de sangre de trucha arcoíris.* (A) *Dot plots* representativos de células EdU positivas de sangre estimuladas con anti-IgM y anti-IgM-Dex a distintas concentraciones (0.1, 0.5 y 1µg/mL) y en condiciones control durante 72 h a 20ºC. (B) Gráficos mostrando el porcentaje de células EdU^+ (media + SEM) de n=6 individuos. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las distintas condiciones. *$p \leq 0.05$.

Para evaluar el efecto del Ab anti-IgM-Dex sobre el proceso de apoptosis de los linfocitos B IgM^+, se preincubaron las células durante 24 o 72 h con los Abs a distintas dosis y,

posteriormente, se midieron los niveles de apoptosis y necrosis con anexina V y DAPI por citometría de flujo.

Los resultados de las células incubadas durante 24 h mostraron una disminución significativa del porcentaje de células en fase de apoptosis temprana (Anexina V^+ $DAPI^-$) en las células estimuladas con anti-IgM-Dex respecto de los leucocitos incubados con anti-IgM, a la dosis mayor de 1 µg/mL (Fig. 3B). Sin embargo, estas diferencias no se mantuvieron a 72 h. En cuanto al porcentaje de células en fase de apoptosis tardía (Anexina$^+$ DAPI$^+$) y muerte celular (Anexina$^-$ DAPI$^+$) se observó una disminución significativa en las células estimuladas con anti-IgM-Dex respecto a las estimuladas con anti-IgM, a 24 h con la dosis 0.5 µg/mL y a 72 h con la concentración de 1 µg/mL (Fig. 3B).

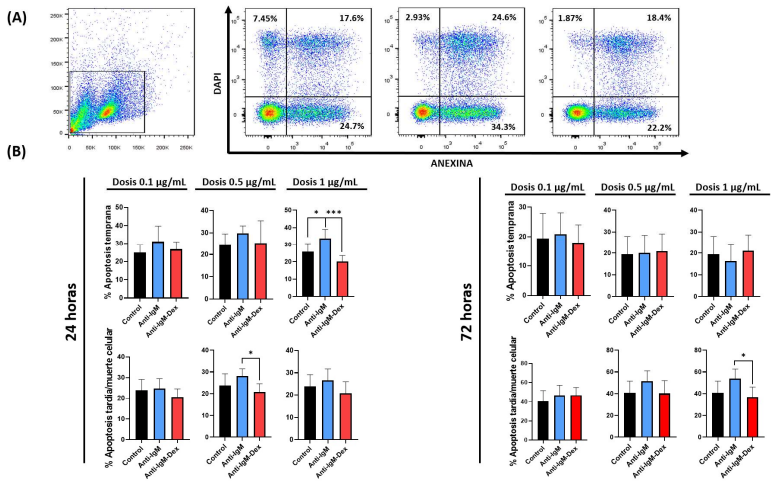

Figura 3. *Efecto de distintas dosis de anti-IgM y anti-IgM-Dex sobre la apoptosis y muerte celular de las células B de truchas arcoíris*. (A) *Dot plots* representativos del análisis de apoptosis mediante tinción con Anexina V y DAPI tras la estimulación de leucocitos sanguíneos con anti-IgM o anti-IgM-Dex a 1 µg/ml tras 24 h. (B) Cuantificación del porcentaje de células en apoptosis temprana y apoptosis tardía/muerte celular tras la estimulación con distintas concentraciones (0.1, 0.5 y 1 µg/mL) de anti-IgM y anti-IgM-Dex durante 24 y 72 h. Los datos se representan como media ± SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas entre condiciones experimentales (*$p \leq 0.05$, **$p \leq 0.01$ y ***$p \leq 0.001$.).

4.2. Efecto de anti-IgM-Dex sobre la activación y proliferación de células B de distintos tejidos de trucha arcoíris.

Para caracterizar la respuesta al anti-IgM-Dex en distintos tejidos, se analizaron el flujo de Ca^{2+} y la proliferación mediante EdU en leucocitos de sangre, bazo y riñón. El ensayo de Ca^{2+} con anti-IgM-Dex a 0,1 µg/mL confirmó que la señal intracelular fue

significativamente mayor con el conjugado respecto al anti-IgM en los tres tejidos, tanto en la fase de activación como en la de estabilización (Fig. 4A, B), aunque las diferencias fueron más marcadas en sangre y bazo que en riñón, donde el porcentaje de células con incremento de Ca^{2+} no alcanzó significación estadística. En conjunto, los linfocitos B IgM^+ de riñón mostraron una menor capacidad de activación en respuesta al anti-IgM-Dex en comparación con los de sangre y bazo.

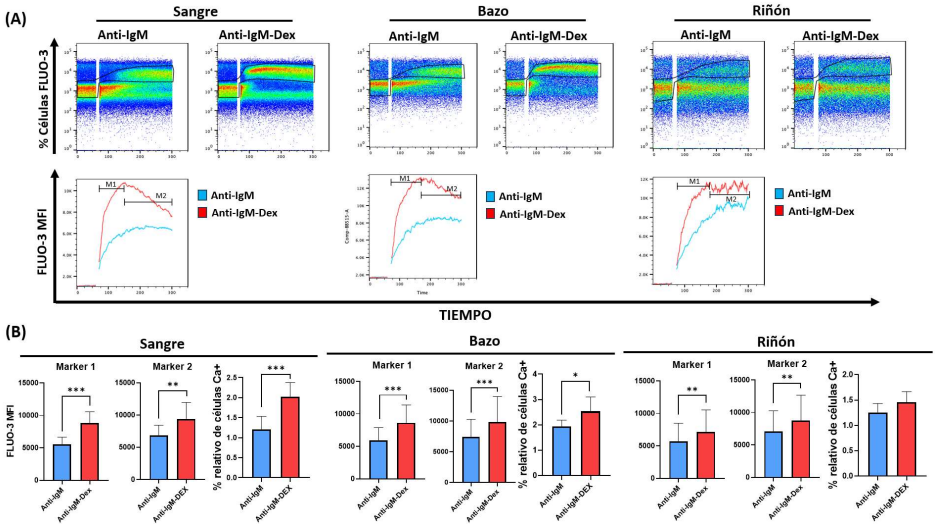

Figura 4. *Análisis de la activación de linfocitos B IgM^+ procedentes de leucocitos de sangre, bazo y riñón de trucha arcoíris mediante flujo de Ca^{2+} tras estimulación con anti-IgM y anti-IgM-Dex.* (A) *Dot plots* y curvas representativas del flujo de Ca^{2+} intracelular en linfocitos B de bazo, riñón y sangre, medido mediante Fluo-3AM tras la estimulación con anti-IgM y anti-IgM-Dex (0.1 µg/mL) por citometría de flujo (B) Gráficas mostrando las medianas de MFI DE Fluo-3AM + SEM (n=6) en la fase de activación (marker 1) y en la fase de meseta (marker 2) y el porcentaje relativo de células que aumentan el Ca^{2+} (Media + SEM). Los asteriscos indican diferencias significativas entre las distintas condiciones. $*p \leq 0.05$; $**p \leq 0.01$ y $***p \leq 0.001$.

En los experimentos de proliferación de células B IgM^+ procedentes de leucocitos de sangre, bazo y riñón, se estimularon los leucocitos en ausencia o presencia de anti-IgM y anti-IgM-Dex a una única concentración de 1 µg/mL. (Fig. 5). En general, se observó un incremento significativo en el porcentaje de células EdU^+ en las muestras estimuladas con anti-IgM-Dex en comparación tanto con el control, como con anti-IgM en el caso de la sangre y el bazo (Fig. 5). Por el contrario, en linfocitos de riñón los valores de proliferación se mantuvieron elevados en todas las condiciones, sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre control, anti-IgM y anti-IgM-Dex.

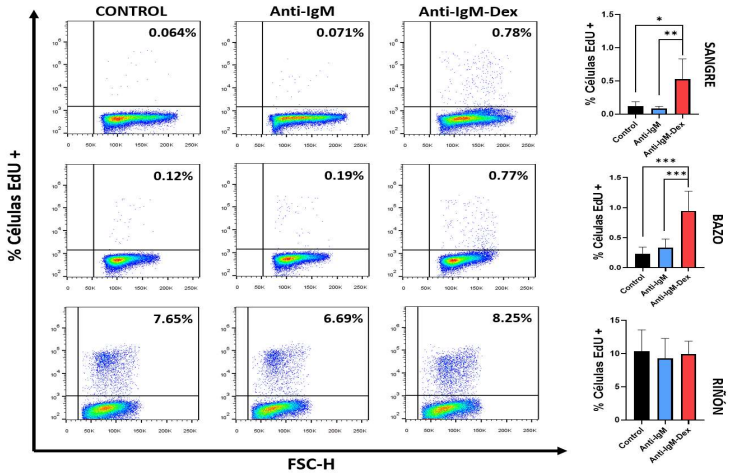

Figura 5. *Proliferación de linfocitos B de trucha arcoíris tras la estimulación con anti-IgM y anti-IgM-Dex evaluada mediante la incorporación de EdU en leucocitos procedentes de distintos tejidos*. En el panel de la izquierda se muestran *dot plots* representativos de células EdU^+ de leucocitos procedentes de sangre, bazo y riñón estimulados con anti-IgM y anti-IgM-Dex a 1µg/mL y en condiciones control durante 72 h a 20ºC. A la derecha se muestran los gráficos con el porcentaje de células EdU^+ (media + SEM) de n=6 individuos. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las distintas condiciones. $*p \leq 0.05$; $**p \leq 0.01$ y $***p \leq 0.001$.

4.3. Efecto de anti-IgM-Dex en la activación y proliferación de células B IgM^+ estimuladas con distintas citoquinas o TNP-LPS.

Se evaluó también la posible sinergia del anti-IgM-Dex con citoquinas relacionadas con la activación de células B (IL-21, BAFF y APRIL) y con el antígeno T-independiente TNP-LPS. Tras 24 h de pre-estimulación con cada estímulo, el ensayo de flujo de Ca^{2+} con anti-IgM-Dex (0,1 µg/mL) no mostró diferencias en la cinética de activación ni en la intensidad de la señal en ninguna de las fases analizadas (Fig. 6A, B), descartando un efecto sinérgico de estos coestímulos sobre la activación del BCR.

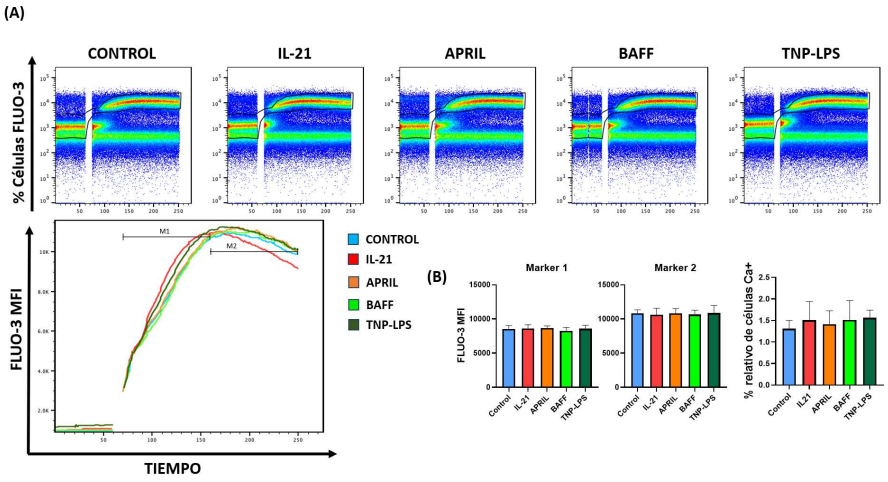

Figura 6. *Flujo de Ca^{2+} de linfocitos B de sangre de trucha arcoíris tras estimulación con anti-IgM y anti-IgM-Dex, en células pre-estimuladas con distintas citoquinas o TNP-LPS.* (A) *Dot plots* y curvas representativas del flujo de calcio en leucocitos de sangre cultivados con diferentes estímulos (IL-21, APRIL, BAFF y TNP-LPS) durante 24 horas y activados con anti-IgM-Dex 0.1 µg/ml, para el ensayo de flujo de Ca2+ durante un tiempo total de 5 minutos (n = 6). (B) Gráficos de barras representando las medianas de MFI de Fluo-3AM + SEM (n = 6) de ambos *markers* (1, fase exponencial; 2, fase de meseta) y el porcentaje relativo de células que aumentan el Ca^{2+} intracelular (Media + SEM).

Además, se analizó la posible sinergia entre IL-21, APRIL o TNP-LPS y los Abs anti-IgM o anti-IgM-Dex (1 µg/mL) sobre la proliferación de linfocitos B de sangre. Las células se incubaron 72 h con los coestímulos, añadiendo los Abs a las 24 h, y la proliferación se evaluó mediante detección de células EdU^+. Ningún coestímulo indujo un aumento significativo de células proliferantes respecto a anti-IgM-Dex en solitario (Fig. 7), confirmando la ausencia de sinergia. Como era de esperar, el anti-IgM-Dex solo mostró un incremento significativo de células EdU^+ respecto al control y a anti-IgM al igual que en combinación con APRIL (Fig. 7).

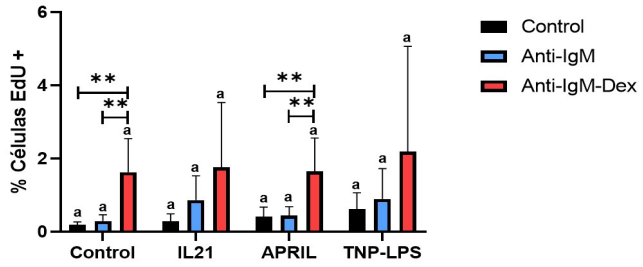

Figura 7. *Proliferación de linfocitos B de sangre de trucha arcoíris tras coestimulación con anti-IgM o anti-IgM-Dex junto con IL-21, APRIL o TNP-LPS.* Los datos se representan como media + SEM (n=6). Los asteriscos indican diferencias significativas entre las distintas condiciones; **p ≤ 0.01.

4.4. Efecto de anti-IgM-Dex sobre la fagocitosis de los linfocitos B procedentes de sangre de trucha arcoíris.

Los linfocitos B IgM$^+$ se cultivaron 24 h con anti-IgM o anti-IgM-Dex (1 µg/mL) y posteriormente se incubaron 3 h con *beads* fluorescentes para evaluar la fagocitosis por citometría de flujo. El porcentaje de células fagocíticas aumentó significativamente con anti-IgM-Dex respecto a anti-IgM y al control, sin observarse diferencias en el MFI entre condiciones (Fig. 8).

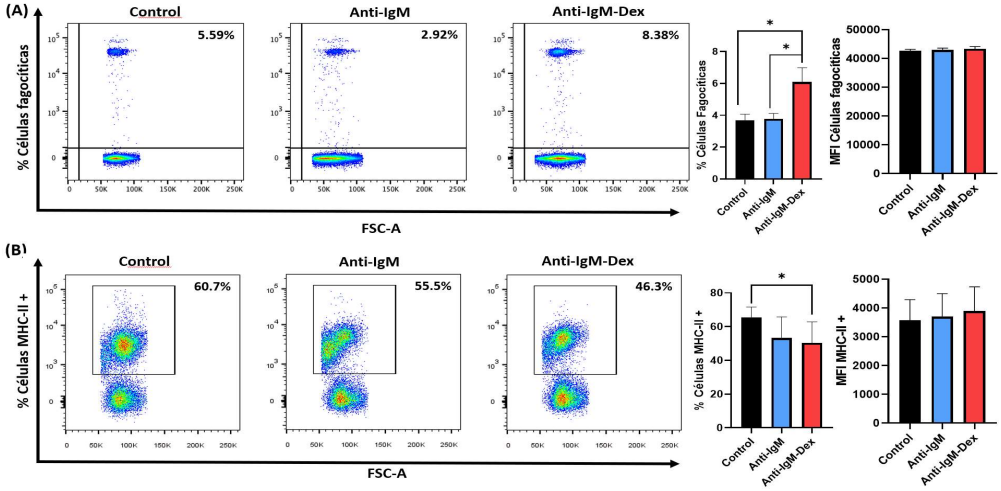

Figura 8. *Efecto de la estimulación del BCR con anti-IgM y anti-IgM-Dex sobre la capacidad fagocítica en linfocitos B de sangre de trucha arcoíris. Dot plots* representativos y cuantificación del porcentaje y MFI de células fagocíticas tras la estimulación con anti-IgM o anti-IgM-Dex. Los datos se muestran como media + SEM de n=6 individuos. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las distintas condiciones. *$p \leq 0.05$.

4.5. Efectos de anti-IgM-Dex en la diferenciación de células B hacia células secretoras de IgM.

Para evaluar el efecto del anti-IgM-Dex sobre la secreción de IgM, los sobrenadantes de leucocitos de sangre estimulados durante 3 h y cultivados 48 h adicionales tras lavado mostraron una reducción significativa de IgM secretada con ambos estímulos respecto al control (Fig. 9A). El análisis de expresión génica de IgM secretada y marcadores de diferenciación a plasmablastos (*prdm1-a1, -a2, -c1, -c2, irf4, bcma* y *pax5*) tras 24 h de estimulación no mostró diferencias significativas entre condiciones (Fig. 9B), por lo que no pueden descartarse interferencias de los anticuerpos anti-IgM en la detección por ELISA, aunque se requieren estudios adicionales para confirmarlo. En cuanto a los genes de quimiocinas y receptores (*ck5b, ccr7a/b, ccr9a/b, cxcr3a/b* y *cxcr4*), tampoco se

detectaron diferencias significativas, aunque el anti-IgM-Dex mostró una tendencia a aumentar la expresión de *ck5b*, *cxcr3b* y *cxcr4*, sugiriendo un posible efecto diferencial del conjugado sobre la activación y el potencial migratorio de los linfocitos B.

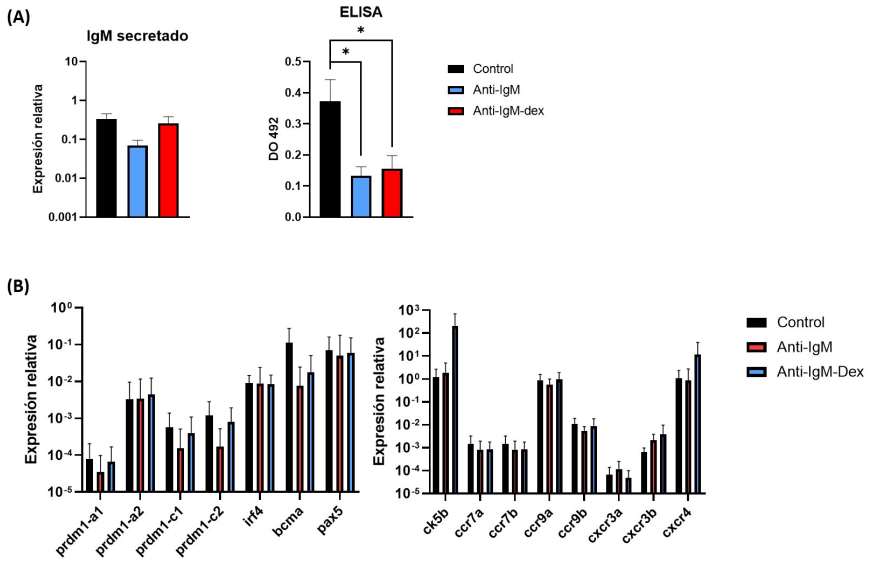

Figura 9. *Perfil de expresión génica de células B de trucha arcoíris tras estimulación con anti-IgM y anti-IgM-Dex.* (A) Producción de IgM determinada mediante ELISA (DO 492 nm) y expresión génica de IgM secretada en células B estimuladas con anti-IgM o anti-IgM-Dex. (B) Análisis de expresión génica relativa mediante qPCR de factores de diferenciación de células B (*prdm1-a1, prdm1-a2, prdm1-c1, prdm1-c2, irf4, bcma* y *pax5*) y receptores de quimiocinas (*ck5b, ccr7a, ccr7b, ccr9a, ccr9b, cxcr3a, cxcr3b* y *cxcr4*) en células B estimuladas con anti-IgM o anti-IgM-Dex. La expresión se representa relativa al gen de *β-actina*. Los resultados se expresan como media + SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas entre grupos (*$p < 0,05$; **$p < 0,01$).

5. DISCUSIÓN.

El sistema inmunitario de los peces teleósteos constituye un modelo de gran interés en el estudio de la evolución de la inmunidad adaptativa. Dentro de este sistema, los linfocitos B desempeñan un papel fundamental no solo en la producción de Igs, sino también en procesos como la presentación antigénica y la fagocitosis (Sunyer, 2012). La activación de estas células depende en gran medida de la cascada de señalización generada a través del BCR, cuya estimulación puede modular respuestas funcionales diversas. En mamíferos, se ha demostrado ampliamente que el entrecruzamiento multivalente del BCR mediante Abs conjugados a dextranos potencia la activación de los linfocitos B en comparación con Abs solubles no conjugados (Brunswick et al., 1988; Rehe et al., 1990). Sin embargo, la información disponible respecto a este mecanismo en peces teleósteos es todavía muy limitada. En este trabajo se ha evaluado por primera vez el efecto del anti-

IgM conjugado a dextranos sobre linfocitos B IgM^+ de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), analizando múltiples parámetros funcionales y moleculares relacionados con la activación, proliferación, apoptosis, fagocitosis y perfil transcripcional.

Los resultados obtenidos en los ensayos de flujo de Ca^{2+} muestran que el anti-IgM-Dex induce una señal de activación temprana significativamente superior a la del anti-IgM no conjugado en todas las concentraciones evaluadas. Este hallazgo es coherente con lo descrito previamente en la literatura, donde se ha establecido una correlación positiva entre el grado de entrecruzamiento del BCR y la magnitud del flujo de calcio intracelular (Berry et al., 2020). La mayor capacidad activadora del conjugado puede atribuirse directamente al incremento de la valencia que confiere el dextrano: al presentar múltiples sitios de unión simultáneos sobre la superficie del linfocito B el dextrano va a favorecer una agrupación más eficiente de los complejos BCR y, en consecuencia, una señalización más intensa. Este efecto ha sido documentado en modelos murinos, donde el aumento de la valencia de Abs anti-Ig se asoció de forma directa a una mayor activación y a una respuesta de Ca^{2+} más robusta (Puffer et al., 2007). Que este mismo patrón se reproduzca en linfocitos B de trucha arcoíris sugiere que los mecanismos de señalización temprana vinculados al entrecruzamiento del BCR están conservados evolutivamente en teleósteos.

Esta mayor activación temprana del BCR se tradujo en un incremento significativo en la proliferación de los linfocitos B IgM^+ estimulados con anti-IgM-Dex frente a los estimulados con anti-IgM no conjugado. Otros estudios respaldan este resultado demostrando que la presentación multivalente de ligandos favorece la agrupación de los receptores de membrana y, como consecuencia directa, una mayor expansión clonal (Lees et al., 1994). Este principio no es exclusivo de las células B; Zheng et al. (2026) demostraron recientemente que *scaffolds* de dextrano conjugados a Abs activadores permiten superar problemas de baja proliferación asociados a una densidad insuficiente de Ab en la expansión in vitro de células T, lo que refuerza la idea de que la arquitectura multimérica del dextrano constituye una estrategia eficaz para potenciar la proliferación linfocitaria con independencia del tipo celular o del receptor diana implicado.

Los ensayos realizados en células procedentes de distintos tejidos revelaron que el efecto activador del anti-IgM-Dex no es homogéneo entre las distintas poblaciones de linfocitos

B IgM$^+$. En linfocitos de sangre y bazo se observó un incremento mayor del flujo de Ca^{2+} con anti-IgM-Dex respecto al Ab no conjugado, que en células de riñón. Además, mientras que en células de sangre y bazo se observó un aumento significativo en la proliferación celular con anti-IgM-Dex en comparación con el Ab no conjugado, en las células de riñón no se detectaron diferencias entre ambos estímulos. Estos resultados sugieren la existencia de subpoblaciones funcionalmente distintas según el tejido de origen, en concordancia con estudios previos que han descrito diferencias transcripcionales y funcionales entre los linfocitos B IgM$^+$ de sangre, bazo y riñón (Abós et al., 2013; Simón et al., 2019). La menor respuesta en activación/proliferación en los linfocitos de riñón podría estar relacionada con su función como principal órgano hematopoyético y nicho de maduración de linfocitos B en teleósteos, donde coexisten células en distintos estados de diferenciación (Zwollo et al., 2005).

En linfocitos B maduros la unión del antígeno al BCR induce activación celular que en ausencia de señales coestimuladoras adecuadas puede inducir mecanismos de apoptosis y muerte celular. Los resultados de los ensayos de apoptosis sugieren que la naturaleza del estímulo sobre el BCR no solo condiciona la activación temprana, sino también el destino celular posterior. En particular, la estimulación con anti-IgM soluble se asoció con un mayor porcentaje de células apoptóticas a 24 h en comparación con anti-IgM-Dex y condiciones control (Fig. 3B). Esta diferencia es coherente con el modelo según el cual la calidad de la señal del BCR, que es determinada no solo por su presencia sino por su intensidad, duración y capacidad de generar un entrecruzamiento efectivo, es determinante para decidir entre supervivencia y muerte celular (Akkaya et al., 2020). En este sentido, la diferencia observada entre ambos estímulos podría reflejar no tanto un efecto tóxico del anti-IgM libre, sino la consecuencia de un entrecruzamiento subóptimo del BCR que no alcanza el umbral necesario para sostener la supervivencia celular.

Con el objetivo de determinar si la activación inducida por anti-IgM-Dex podía potenciarse mediante señales coestimuladoras, se evaluó su combinación con IL-21, BAFF, APRIL y el antígeno T-independiente TNP-LPS. Sin embargo, ninguno de estos estímulos incrementó significativamente la activación ni la proliferación inducidas por el conjugado. Este resultado resulta especialmente relevante en el caso de TNP-LPS, ya que

los linfocitos B IgM^+ de trucha responden preferentemente a este tipo de antígenos y suelen requerir la integración de señales del BCR y de receptores innatos para una activación óptima (Granja et al., 2019). La ausencia de sinergia observada sugiere que el anti-IgM-Dex genera una señal suficientemente intensa para alcanzar un umbral máximo de activación, limitando el efecto de estímulos adicionales. Esta interpretación es consistente con trabajos previos que indican que la relevancia de las señales coestimuladoras depende de que la activación inicial del BCR sea limitante (Smith et al., 2019).

En lo que respecta a las funciones efectoras, los resultados de fagocitosis mostraron un aumento significativo en el porcentaje de células fagocíticas en las células estimuladas con anti-IgM-Dex comparado con anti-IgM sin conjugar y con las células control sin estimular. La capacidad fagocítica de los linfocitos B de teleósteos ha sido descrita previamente en truchas arcoíris (Wu et al., 2022), y el hecho de que su modulación dependa del tipo de estímulo recibido sobre el BCR añade una nueva dimensión funcional a la activación diferencial observada.

En cuanto al estudio de la diferenciación de los linfocitos B de sangre a células secretoras de IgM, el ELISA mostró una disminución significativa en los niveles de IgM secretado tanto con anti-IgM como con el conjugado a dextranos. Sin embargo, los valores de expresión génica no mostraron diferencias significativas, creando la duda de posibles interferencias del Ab de estimulación con el de detección durante el ensayo de ELISA. A nivel transcripcional se analizó la expresión de genes asociados a la diferenciación de linfocitos B hacia células secretoras de Abs. En mamíferos, el gen *prdm1* codifica para el factor de transcripción BLIMP1 que constituye el regulador por excelencia de la diferenciación terminal hacia células plasmáticas, mientras que IRF4 participa en la activación de este programa transcripcional y PAX5 mantiene la identidad del linfocito B maduro (Nutt et al., 2015). La presencia de múltiples parálogos de *prdm1* en trucha arcoíris refleja la complejidad génica derivada de los eventos de duplicación característicos de los teleósteos. Sin embargo, en las condiciones experimentales evaluadas no se observaron diferencias significativas en la expresión de ninguno de estos genes entre los distintos grupos de estimulación. La ausencia de cambios significativos

resulta especialmente relevante si se considera que el Ab anti-IgM-Dex indujo una activación funcional superior, evidenciada por el incremento del flujo de Ca^{2+} y de la proliferación celular. Estos resultados sugieren que una activación más intensa del BCR no implica necesariamente la inducción de programas transcripcionales asociados a la diferenciación terminal hacia células plasmáticas. Es posible que la señal proporcionada por el entrecruzamiento multivalente del BCR sea suficiente para promover activación y expansión clonal, pero insuficiente para desencadenar procesos de diferenciación más avanzados, los cuales probablemente requieran señales adicionales procedentes de células T colaboradoras, citocinas específicas o factores presentes en el microambiente tisular (Nutt et al., 2015).

En cuanto al perfil de receptores de quimiocinas, moléculas implicadas en la migración y el posicionamiento de los linfocitos durante la respuesta inmunitaria, sólo se observó una tendencia hacia mayores niveles de expresión en las células estimuladas con anti-IgM-Dex en los genes *ck5b, cxcr3b* y *cxcr4*. CK5B es un homólogo de CCL5/RANTES en mamífero, que actúa como quimioquina proinflamatoria, atrayendo células inmunes a zonas donde existe infección o daño tisular. CXCR3 regula la migración de leucocitos durante la inflamación y CXCR4 regula procesos de *homing* y diferenciación de células plasmáticas (Förster et al., 1999; Hargreaves et al., 2001). No se puede concluir si este ligero aumento en la expresión de estos genes podría tener consecuencias en la respuesta migratoria de células B activadas con anti-IgM-Dex. Es posible que estos cambios puedan producirse en fases más tardías de la activación o requerir señales adicionales derivadas del microambiente tisular.

Una de las principales limitaciones de este estudio es que todos los experimentos se realizaron en condiciones *in vitro*, por lo que las respuestas observadas podrían no reflejar completamente la complejidad de los procesos que tienen lugar *in vivo*. Del mismo modo, la disminución en la secreción de IgM y la ausencia de cambios significativos en la expresión génica de marcadores de diferenciación a células plasmáticas podría estar relacionada con el tiempo de incubación seleccionado, así como con la ausencia de señales coestimuladoras. Finalmente, este trabajo se centró exclusivamente en linfocitos B IgM^+, sin abordar otras subpoblaciones de células B presentes en teleósteos, como las

células IgT^+, que desempeñan funciones importantes en la inmunidad de mucosas (Tafalla et al., 2017; Y.-A. Zhang et al., 2010).

En conjunto, los resultados de este trabajo demuestran que el anti-IgM conjugado a dextrano constituye un estímulo cualitativamente superior al anti-IgM no conjugado para la activación de linfocitos B de trucha arcoíris, con efectos diferenciales sobre la señalización temprana, la proliferación, la supervivencia y determinadas funciones efectoras. Estos hallazgos son consistentes con lo descrito en modelos de mamíferos (Brunswick et al., 1988; Rehe et al., 1990; Snapper, 2016) y ponen de manifiesto que el aumento del grado de entrecruzamiento del BCR constituye un mecanismo eficaz para potenciar la activación de linfocitos B también en teleósteos. La extensión de esta aproximación al estudio de la biología de los linfocitos B en peces proporciona una nueva herramienta para investigar los mecanismos de activación de estas células y podría resultar de interés para futuras estrategias de inmunomodulación y vacunación en acuicultura.

6. CONCLUSIONES.

- El anti-IgM-Dex induce una activación temprana del BCR más intensa que el anti-IgM libre en linfocitos B IgM^+ de trucha arcoíris, evidenciada por un mayor flujo de Ca^{2+} y una mayor proliferación celular en todas las dosis evaluadas, en consonancia con el principio de que la multivalencia aportada por los dextranos favorece una agrupación más eficiente del BCR y una mayor expansión clonal.
- Los linfocitos B IgM^+ presentan una respuesta diferencial al anti-IgM-Dex según el tejido de origen: mientras que en sangre y bazo se observó un incremento significativo de la activación y la proliferación, en riñón no se detectaron diferencias significativas entre condiciones, evidenciando una heterogeneidad funcional entre subpoblaciones tisulares.
- La estimulación con anti-IgM soluble se asoció a una mayor tendencia a la apoptosis respecto al anti-IgM-Dex, lo que sugiere que un entrecruzamiento subóptimo del BCR no alcanza el umbral necesario para sostener la supervivencia celular y que la intensidad de la señal determina el destino celular.

- El anti-IgM-Dex incrementa significativamente el porcentaje de células fagocíticas en sangre, evidenciando que la intensidad del entrecruzamiento del BCR modula funciones efectoras innatas de los linfocitos B de teleósteos.
- La estimulación con anti-IgM-Dex no indujo cambios significativos en genes de diferenciación plasmática (*prdm1, irf4, bcma, pax5*) ni fue potenciada por citoquinas o TNP-LPS, lo que sugiere que, aunque el conjugado genera por sí mismo una señal de activación altamente eficiente, esta no es suficiente para desencadenar diferenciación terminal en ausencia de señales adicionales.
- En conjunto, el anti-IgM-Dex se establece como un estímulo cualitativamente superior al anti-IgM convencional para la activación de linfocitos B de trucha arcoíris, con potencial aplicación como herramienta en inmunología de teleósteos y en el desarrollo de estrategias vacunales en acuicultura.

7. BIBLIOGRAFÍA.

Abós, B., Castro, R., Pignatelli, J., Luque, A., González, L., & Tafalla, C. (2013). Transcriptional Heterogeneity of IgM+ Cells in Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss) Tissues. *PLoS ONE*, *8*(12), e82737. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082737

Abós, B., Wang, T., Castro, R., Granja, A. G., Leal, E., Havixbeck, J., Luque, A., Barreda, D. R., Secombes, C. J., & Tafalla, C. (2016). Distinct Differentiation Programs Triggered by IL-6 and LPS in Teleost IgM+ B Cells in The Absence of Germinal Centers. *Scientific Reports*, *6*(1), 30004. https://doi.org/10.1038/srep30004

Abos, B., Wang, T., Secombes, C. J., & Tafalla, C. (2020). Distinct modes of action of CD40L and adaptive cytokines IL-2, IL-4/13, IL-10 and IL-21 on rainbow trout IgM+ B cells. *Developmental & Comparative Immunology*, *111*, 103752. https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103752

Akkaya, M., Kwak, K., & Pierce, S. K. (2020). B cell memory: Building two walls of protection against pathogens. *Nature Reviews Immunology*, *20*(4), 229-238. https://doi.org/10.1038/s41577-019-0244-2

Berry, C. T., Liu, X., Myles, A., Nandi, S., Chen, Y. H., Hershberg, U., Brodsky, I. E., Cancro, M. P., Lengner, C. J., May, M. J., & Freedman, B. D. (2020). BCR-Induced Ca2+ Signals Dynamically Tune Survival, Metabolic Reprogramming, and Proliferation of Naive B Cells. *Cell Reports*, *31*(2), 107474. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.03.038

Brunswick, M., Finkelman, F. D., Highet, P. F., Inman, J. K., Dintzis, H. M., & Mond, J. J. (1988). Picogram quantities of anti-Ig antibodies coupled to dextran induce B cell proliferation. *Journal of Immunology*, *140*(10), 3364-3372.

Castro, R., Bromage, E., Abós, B., Pignatelli, J., González Granja, A., Luque, A., & Tafalla, C. (2014). CCR7 Is Mainly Expressed in Teleost Gills, Where It Defines an IgD+IgM− B Lymphocyte Subset. *The Journal of Immunology*, *192*(3), 1257-1266. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302471

Courtney, A. H., Puffer, E. B., Pontrello, J. K., Yang, Z.-Q., & Kiessling, L. L. (2009). Sialylated multivalent antigens engage CD22 *in trans* and inhibit B cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(8), 2500-2505. https://doi.org/10.1073/pnas.0807207106

Fillatreau, S., Six, A., Magadan, S., Castro, R., Sunyer, J. O., & Boudinot, P. (2013). The astonishing diversity of Ig classes and B cell repertoires in teleost fish. *Frontiers in Immunology*, *4*, 28. https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00028

Fleige, L., & Capellino, S. (2024). Simultaneous Stimulation of Peripheral Blood Mononuclear Cells with CpG ODN2006 and α-IgM Antibodies Leads to Strong Immune Responses in

Monocytes Independent of B Cell Activation. *Cells*, *13*(22), 1822. https://doi.org/10.3390/cells13221822

Förster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Müller, I., Wolf, E., & Lipp, M. (1999). CCR7 Coordinates the Primary Immune Response by Establishing Functional Microenvironments in Secondary Lymphoid Organs. *Cell*, *99*(1), 23-33. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80059-8

Granja, A. G., Perdiguero, P., Martín-Martín, A., Díaz-Rosales, P., Soleto, I., & Tafalla, C. (2019). Rainbow Trout IgM+ B Cells Preferentially Respond to Thymus-Independent Antigens but Are Activated by CD40L. *Frontiers in Immunology*, *10*, 2902. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02902

Granja, A. G., & Tafalla, C. (2019). Different IgM+ B cell subpopulations residing within the peritoneal cavity of vaccinated rainbow trout are differently regulated by BAFF. *Fish & Shellfish Immunology, Targeting Fish Vaccination*, *85*, 9-17. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.10.003

Hargreaves, D. C., Hyman, P. L., Lu, T. T., Ngo, V. N., Bidgol, A., Suzuki, G., Zou, Y.-R., Littman, D. R., & Cyster, J. G. (2001). A Coordinated Change in Chemokine Responsiveness Guides Plasma Cell Movements. *The Journal of Experimental Medicine*, *194*(1), 45-56. https://doi.org/10.1084/jem.194.1.45

Lanzavecchia, A. (1985). Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature*, *314*(6011), 537-539. https://doi.org/10.1038/314537a0

Lees, A., Finkelman, F., Inman, J. K., Witherspoon, K., Johnson, P., Kennedy, J., & Mond, J. J. (1994). Enhanced immunogenicity of protein-dextran conjugates: I. Rapid stimulation of enhanced antibody responses to poorly immunogenic molecules. *Vaccine*, *12*(13), 1160-1166. https://doi.org/10.1016/0264-410X(94)90237-2

Mukherjee, S., Zhu, J., Zikherman, J., Parameswaran, R., Kadlecek, T. A., Wang, Q., Au-Yeung, B., Ploegh, H., Kuriyan, J., Das, J., & Weiss, A. (2013). Monovalent and multivalent ligation of the B cell receptor exhibit differential dependence upon Syk and Src family kinases. *Science Signaling*, *6*(256), ra1. https://doi.org/10.1126/scisignal.2003220

Nutt, S. L., Hodgkin, P. D., Tarlinton, D. M., & Corcoran, L. M. (2015). The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nature Reviews Immunology*, *15*(3), 160-171. https://doi.org/10.1038/nri3795

Peçanha, L. M., Snapper, C. M., Finkelman, F. D., & Mond, J. J. (1991). Dextran-conjugated anti-Ig antibodies as a model for T cell-independent type 2 antigen-mediated stimulation

of Ig secretion in vitro. I. Lymphokine dependence. *Journal of Immunology*, *146*(3), 833-839.

Peçanha, L. M., Yamaguchi, H., Lees, A., Noelle, R. J., Mond, J. J., & Snapper, C. M. (1993). Dextran-conjugated anti-IgD antibodies inhibit T cell-mediated IgE production but augment the synthesis of IgM and IgG. *The Journal of Immunology*, *150*(6), 2160-2168. https://doi.org/10.4049/jimmunol.150.6.2160

Perdiguero, P., Martín-Martín, A., Benedicenti, O., Díaz-Rosales, P., Morel, E., Muñoz-Atienza, E., García-Flores, M., Simón, R., Soleto, I., Cerutti, A., & Tafalla, C. (2019). Teleost IgD+IgM− B Cells Mount Clonally Expanded and Mildly Mutated Intestinal IgD Responses in the Absence of Lymphoid Follicles. *Cell Reports*, *29*(13), 4223-4235.e5. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.101

Perdiguero, P., Morel, E., Díaz-Rosales, P., & Tafalla, C. (2021). Individual B cells transcribe multiple rearranged immunoglobulin light chains in teleost fish. *iScience*, *24*(6), 102615. https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102615

Puffer, E. B., Pontrello, J. K., Hollenbeck, J. J., Kink, J. A., & Kiessling, L. L. (2007). Activating B Cell Signaling with Defined Multivalent Ligands. *ACS Chemical Biology*, *2*(4), 252-262. https://doi.org/10.1021/cb600489g

Rehe, G. T., Katona, I. M., Brunswick, M., Wahl, L. M., June, C. H., & Mond, J. J. (1990). Activation of human B lymphocytes by nanogram concentrations of anti-IgM-dextran conjugates. *European Journal of Immunology*, *20*(8), 1837-1842. https://doi.org/10.1002/eji.1830200831

Rodríguez-Pinto, D. (2005). B cells as antigen presenting cells. *Cellular Immunology*, *238*(2), 67-75. https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2006.02.005

Salinas, I. (2015). The Mucosal Immune System of Teleost Fish. *Biology*, *4*(3), 525-539. https://doi.org/10.3390/biology4030525

Salinas, I., & Miller, R. D. (2015). Comparative Phylogeny of the Mucosa-Associated Lymphoid Tissue. En *Mucosal Immunology* (pp. 145-159). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415847-4.00010-0

Scharenberg, A. M., Humphries, L. A., & Rawlings, D. J. (2007). Calcium signalling and cell-fate choice in B cells. *Nature Reviews Immunology*, *7*(10), 778-789. https://doi.org/10.1038/nri2172

Simón, R., Díaz-Rosales, P., Morel, E., Martín, D., Granja, A. G., & Tafalla, C. (2019). CpG Oligodeoxynucleotides Modulate Innate and Adaptive Functions of IgM+ B Cells in Rainbow Trout. *Frontiers in Immunology*, *10*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00584

Smith, N. C., Rise, M. L., & Christian, S. L. (2019). A Comparison of the Innate and Adaptive Immune Systems in Cartilaginous Fish, Ray-Finned Fish, and Lobe-Finned Fish. *Frontiers in Immunology*, *10*, 2292. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02292

Snapper, C. M. (2016). Dextran-Conjugated Anti-Immunoglobulin Antibodies: A Powerful Tool for Studying B Cell Receptor-Mediated Signaling. *International Journal of Immunology and Immunotherapy*, *3*(2). https://doi.org/10.23937/2378-3672/1410022

Snapper, C. M., Yamada, H., Smoot, D., Sneed, R., Lees, A., & Mond, J. J. (1993). Comparative in vitro analysis of proliferation, Ig secretion, and Ig class switching by murine marginal zone and follicular B cells. *Journal of Immunology*, *150*(7), 2737-2745.

Sunyer, J. O. (2012). Evolutionary and Functional Relationships of B Cells from Fish and Mammals: Insights into their Novel Roles in Phagocytosis and Presentation of Particulate Antigen. *Infectious Disorders - Drug Targets*, *12*(3), 200-212. https://doi.org/10.2174/187152612800564419

Sunyer, J. O. (2013). Fishing for mammalian paradigms in the teleost immune system. *Nature Immunology*, *14*(4), 320-326. https://doi.org/10.1038/ni.2549

Tafalla, C., González, L., Castro, R., & Granja, A. G. (2017). B Cell-Activating Factor Regulates Different Aspects of B Cell Functionality and Is Produced by a Subset of Splenic B Cells in Teleost Fish. *Frontiers in Immunology*, *8*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00295

Van Ginkel, F. W., Miller, N. W., Cuchens, M. A., & Clem, L. W. (1994). Activation of channel catfish B cells by membrane immunoglobulin cross-linking. *Developmental & Comparative Immunology*, *18*(2), 97-107. https://doi.org/10.1016/0145-305X(94)90238-0

Wen, Y., Jing, Y., Yang, L., Kang, D., Jiang, P., Li, N., Cheng, J., Li, J., Li, X., Peng, Z., Sun, X., Miller, H., Sui, Z., Gong, Q., Ren, B., Yin, W., & Liu, C. (2019). The regulators of BCR signaling during B cell activation. *Blood Science*, *1*(2), 119-129. https://doi.org/10.1097/BS9.0000000000000026

Westbroek, M. L., & Geahlen, R. L. (2017). Modulation of BCR Signaling by the Induced Dimerization of Receptor-Associated SYK. *Antibodies*, *6*(4), 23. https://doi.org/10.3390/antib6040023

Wu, L., Yang, Y., Gao, A., Li, J., & Ye, J. (2022). Teleost fish IgM+ plasma-like cells possess IgM-secreting, phagocytic, and antigen-presenting capacities. *Frontiers in Immunology*, *13*, 1016974. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1016974

Xu, Z., Takizawa, F., Parra, D., Gómez, D., Von Gersdorff Jørgensen, L., LaPatra, S. E., & Sunyer, J. O. (2016). Mucosal immunoglobulins at respiratory surfaces mark an ancient

association that predates the emergence of tetrapods. *Nature Communications*, *7*(1), 10728. https://doi.org/10.1038/ncomms10728

Yasuda, S., Zhou, Y., Wang, Y., Yamamura, M., & Wang, J.-Y. (2017). A model integrating tonic and antigen-triggered BCR signals to predict the survival of primary B cells. *Scientific Reports*, *7*(1), 14888. https://doi.org/10.1038/s41598-017-13993-x

Ye, J., Kaattari, I. M., Ma, C., & Kaattari, S. (2013). The teleost humoral immune response. *Fish & Shellfish Immunology*, *35*(6), 1719-1728. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.10.015

Zapata, A., & Amemiya, C. T. (2000). Phylogeny of Lower Vertebrates and Their Immunological Structures. En L. Du Pasquier & G. W. Litman (Eds.), *Origin and Evolution of the Vertebrate Immune System* (pp. 67-107). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-59674-2_5

Zhang, W., An, M., Xi, J., & Liu, H. (2017). Targeting CpG Adjuvant to Lymph Node via Dextran Conjugate Enhances Antitumor Immunotherapy. *Bioconjugate Chemistry*, *28*(7), 1993-2000. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00313

Zhang, X.-J., Wang, P., Zhang, N., Chen, D.-D., Nie, P., Li, J.-L., & Zhang, Y.-A. (2017). B Cell Functions Can Be Modulated by Antimicrobial Peptides in Rainbow Trout Oncorhynchus mykiss: Novel Insights into the Innate Nature of B Cells in Fish. *Frontiers in Immunology*, *8*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00388

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

Zheng, T., Ramanathan, K., Ormhøj, M., Hansen, M. R., Halldórsdóttir, H. R., Li, H., Munk, K. K., Rodriguez-Pardo, C., Friis, R. U. W., Seder, I., Heegaard, P. M. H., Qvortrup, K., Abken, H., Sun, Y., & Hadrup, S. R. (2026). Dextran-based T-cell expansion nanoparticles for manufacturing CAR T cells with augmented efficacy. *Nature Communications*, *17*(1), 1103. https://doi.org/10.1038/s41467-025-67868-1

Zwollo, P. (2011). Dissecting teleost B cell differentiation using transcription factors. *Developmental & Comparative Immunology, Special issue: In Honour of Gregory Warr*, *35*(9), 898-905. https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.01.009

Zwollo, P., Cole, S., Bromage, E., & Kaattari, S. (2005). B Cell Heterogeneity in the Teleost Kidney: Evidence for a Maturation Gradient from Anterior to Posterior Kidney1. *The Journal of Immunology*, *174*(11), 6608-6616. https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.11.6608

Zwollo, P., Mott, K., & Barr, M. (2010). Comparative analyses of B cell populations in trout kidney and mouse bone marrow: Establishing “B cell signatures”. *Developmental & Comparative Immunology*, *34*(12), 1291-1299. https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.08.003