TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Biomedicina

LA PSEUDOBRANQUIA COMO ÓRGANO IMUNITARIO: CARACTERIZACIÓN LINFOCITARIA Y RESPUESTA FRENTE AL VIRUS DE LA NECROSIS HEMATOPOYÉTICA INFECCIOSA (IHNV) EN TRUCHA ARCOÍRIS

Autor/es: **Diana Victoria Fagúndez Villamizar**

Villaviciosa de Odón, *Junio, 2026*

ANEXO IX

Título del Trabajo: "La pseudobranquia como órgano imunitario: caracterización linfocitaria y respuesta frente al virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV) en trucha arcoíris."

Este trabajo ha sido realizado en el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), específicamente dentro del grupo de investigación de Inmunología y Patología de Peces, adscrito al Departamento de Biotecnología. Este grupo forma parte del área de investigación animal y centra su actividad en el estudio de los mecanismos inmunológicos y patológicos que afectan a las especies acuícolas.

Tutores externos: Carolina Tafalla Piñeiro y Ángela Etayo

Tutor de universidad: María Teresa Coiras Lopez

Agradecimientos

La realización de este Trabajo Fin de Grado no solo representa el fin de una etapa como estudiante de la Universidad Europea de Madrid, sino el comienzo de muchos grandes objetivos a cumplir a largo plazo. Sin embargo, de no haber sido por las personas a las que mencionaré a continuación, no hubiese podido llegar hasta aquí.

Quiero empezar agradeciendo a mis profesores de la universidad, a cada uno de ellos por haber sembrado en mí la semilla de la curiosidad y la pasión por la investigación. A mi tutora Mayte, que no sólo me ha ayudado durante la realización de este trabajo, sino que también ha sido la persona que despertó en mí la pasión por la inmunología. También quiero agradecer al grupo de investigación liderado por Carolina Tafalla, que no sólo me hicieron sentir parte del equipo como una más, sino que se tomaron el tiempo de adentrarme en el mundo de los peces y motivarme a seguir apostando por la investigación en ciencias. Quiero agradecer especialmente a Ángela, quien día a día estuvo conmigo dándome apoyo y guía para perfeccionar este trabajo, sin su ayuda no hubiese sido posible.

Quiero agradecer además a mis amigos, a los que se encuentran lejos y a los que están tan cerca, porque siempre creyeron en mí y en que podía lograrlo incluso cuando yo misma no creía. Especialmente agradezco a Candela, mi compañera de clase que se convirtió en mi mejor amiga e incluso mi hermana, por acompañarme todos estos años en mi formación y motivarme siempre a seguir adelante, aunque muchas veces quisiera rendirme. También a Arturo, mi amor, por todo el apoyo y la motivación que me brindaba cada día y por salvarme muchas veces con sus atenciones cuando más estresada me encontraba.

Agradezco también a mi familia en Venezuela, por dejarme volar para venir a cumplir mis sueños. Por apoyarme en la distancia, por preocuparse por mí, por celebrar cada uno de mis logros como si fuesen suyos, por presumirme frente a la gente, pero sobre todo por esperarme siempre con los brazos abiertos desde donde están. Sé que no fue fácil dejarme partir. Gracias a Dios por la oportunidad de vivir un día más, un sueño más. Por último, agradezco a mis padres: Gil y María, que, con su apoyo, esfuerzo, consejos, cariño y tiempo, me han llevado hasta aquí, ustedes han formado a la mujer en la que me he convertido y son los pilares fundamentales de mi vida. Les debo todo lo que soy y todo lo que he construido.

Gracias a todos los que formaron parte de este camino. Este logro lleva mi nombre, pero también un pedacito de cada uno de ustedes.

¡GRACIAS!

ÍNDICE

1. RESUMEN 5

2. INTRODUCCIÓN 6

2.1. La acuicultura: 6
2.2. Sistema inmune en teleósteos: 6
2.3. La branquia: 9
2.4. La pseudobranquia: 10
2.5. Virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV): 10

3. HIPOTESIS 12

4. OBJETIVOS 12

4.1. Objetivos generales 12
4.2. Objetivos específicos 12

5. METODOLOGÍA 12

5.1. Diseño experimental 12
5.2. Condiciones de cultivo de los peces 13
5.3. Análisis histológico 14
5.4. Obtención de leucocitos de branquia y pseudobranquia 14
5.5. Caracterización linfocitaria en branquias y pseudobranquia mediante citometría de flujo 15
5.6. Inmunofluorescencia 15
5.7. Infección de los peces con IHNV 16
5.8. Aislamiento de ARN y análisis qPCR 17
5.9. Evaluación de la expresión de genes inmunitarios mediante PCR en tiempo real. 17
5.10. Análisis estadístico 18

6. RESULTADOS 18

6.1. Caracterización histológica de pseudobranquia y branquia (Hematoxilina–Eosina). 18
6.1.1. Morfología general de la pseudobranquia 18
6.1.2. Morfología general de la branquia 19
6.2. Caracterización de la población linfocitaria en branquia y pseudobranquia de trucha 20
6.2.1. Citometría de flujo 20
6.2.2. Inmunofluorescencia 22
6.3. Modulación génica de la respuesta de linfocitos T y B frente a una infección con IHNV 23

7. DISCUSIÓN 28

8. CONCLUSIONES 33

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 34

10. ANEXOS 38

1. Resumen

La pseudobranquia es una estructura poco estudiada en peces teleósteos, tradicionalmente asociada a funciones fisiológicas no inmunitarias. Sin embargo, su localización, irrigación y similitud anatómica con tejidos mucosos sugieren un posible papel en la vigilancia inmunitaria. En este trabajo se caracterizó por primera vez el repertorio linfoide de la pseudobranquia de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y su respuesta frente al virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV), un patógeno de declaración obligatoria en la Unión Europea. Mediante citometría de flujo se identificaron poblaciones definidas de linfocitos B IgM^+, IgD^+ e IgM^+IgD^+, así como linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$, mostrando un perfil comparable al de la branquia. La inmunofluorescencia confocal confirmó la presencia de células T $CD4^+$ y $CD8^+$ en pseudobranquia, aportando evidencia visual directa de su actividad inmunitaria local. En condiciones basales, la pseudobranquia presentó incluso un porcentaje relativamente mayor de células B que la branquia, lo que podría reflejar un papel relevante en la inmunidad humoral. Tras la infección experimental con IHNV, el análisis de expresión génica reveló una activación antiviral clara tanto en branquia como en pseudobranquia. En concreto, se detectó una fuerte inducción de genes citotóxicos (perforina y granzima), especialmente marcada en pseudobranquia, lo que sugiere una respuesta efectora robusta en este órgano. En conjunto, estos resultados demuestran que la pseudobranquia posee un repertorio linfoide completo y es capaz de montar respuestas antivirales activas, apoyando su consideración como un órgano inmunitario funcional en teleósteos.

PALABRAS CLAVE: pseudobranquia; branquia; trucha arcoíris; IHNV; sistema inmune

2. Introducción

2.1. La acuicultura:

La acuicultura consiste en la cría controlada de organismos acuáticos —incluyendo peces, moluscos y crustáceos— para la producción de alimentos y la conservación de ecosistemas (Mohd Faudzi et al., 2024). El aumento de la demanda global y la necesidad de prácticas sostenibles han impulsado a la piscicultura a convertirse en uno de los sectores alimentarios de mayor crecimiento, clave para el suministro de proteínas de alta calidad (Mkulo et al., 2025). Según la FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), la producción acuícola mundial supera ya los 100 millones de toneladas anuales y continúa en expansión, siendo más eficiente y con menor impacto ambiental que la ganadería terrestre. La mayor parte procede de sistemas de agua dulce, donde destacan especies como carpas, tilapias y truchas. (FAO, 2024). En España, la producción se ha diversificado, manteniendo a la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) como especie emblemática por su relevancia económica y ecológica (APROMAR-OPP30, 2024). No obstante, los sistemas intensivos afrontan desafíos importantes, como el estrés, la aparición de enfermedades y el uso excesivo de antimicrobianos, que favorecen la resistencia bacteriana. Por ello, se requieren estrategias preventivas sostenibles que mejoren el bienestar animal y la bioseguridad. La vacunación constituye la herramienta más eficaz, pero su desarrollo exige un conocimiento profundo del sistema inmunitario de los peces (Buchmann & Secombes, 2022).

2.2. Sistema inmune en teleósteos:

La función esencial que ejerce el sistema inmune en los vertebrados es la defensa contra infecciones, permitiendo que el individuo mantenga sus funciones corporales en un medio hostil. (Olabuenaga, 2000). El sistema inmune de peces teleósteos consta de dos ramas principales; la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. Ambas comparten numerosas similitudes con los sistemas inmunitarios de los vertebrados superiores. Sin embargo, dado que los teleósteos representan el linaje de vertebrados más antiguo y diverso, también presentan diferencias importantes en cuanto a su funcionalidad, la diversidad de sus células inmunes y la organización de sus estructuras linfoides.

Al igual que en mamíferos, el sistema inmunitario innato de los peces constituye la primera línea de defensa y actúa rápidamente frente a patógenos, aunque no genera una protección

duradera. El sistema inmune innato es especialmente crucial para impedir la entrada de agentes infecciosos, debido a la menor eficiencia y rapidez de su respuesta adaptativa. Este sistema inmunitario innato se divide en tres grandes componentes: barreras físicas, factores humorales y elementos celulares (Kordon et al., 2018). Las barreras físicas incluyen las escamas (en el caso de la piel), el mucus y las células epiteliales que recubren las superficies mucosas tales como la piel, las branquias y el tracto digestivo, desempeñando un papel esencial en la protección frente a infecciones. Las células caliciformes producen el mucus, donde sustancias antimicrobianas atrapan patógenos e impiden su propagación. Este mucus contiene numerosas moléculas inmunitarias asociadas al sistema innato —como lectinas, pentraxinas, lisozima, proteínas del complemento, péptidos antimicrobianos e inmunoglobulinas (Igs) naturales/innatas— capaces de bloquear o eliminar microorganismos. Además del mucus, la epidermis formada por células epiteliales actúa como barrera frente a agentes externos y alberga células efectoras como macrófagos y linfocitos (Abós et al., 2022). Por ello, tanto el mucus como el epitelio funcionan como barreras físicas y químicas frente a microorganismos y sustancias extrañas (Salinas, 2015).

Los peces viven expuestos de forma constante a un entorno acuático rico en microorganismos que contactan con todas sus superficies epiteliales. Por ello, a diferencia de los animales terrestres, deben afrontar una carga microbiana mucho mayor que desafía continuamente sus barreras mucosas. Así como en mamíferos, estas barreras están asociadas a distintos tejidos linfoides mucosos (MALT, del inglés mucosa-associated lymphoid tissues). En peces, los MALT se dividen de acuerdo a su localización en: intestinal (GALT), cutáneo (SALT), branquial (GIALT) y el recientemente descrito nasofaríngeo (NALT). Cuando cualquiera de estas superficies detecta una señal de peligro, se activa de inmediato la inmunidad innata, que constituye el paso inicial necesario para el posterior desarrollo de la respuesta adaptativa. (Salinas, 2015).

La inmunidad adaptativa de los peces teleósteos se traduce en una respuesta más específica ejecutada principalmente por linfocitos B y T que se activan tras la respuesta innata y permiten respuestas más eficaces y duraderas frente a infecciones y exposiciones repetidas (Abós et al., 2022). Opera tanto a nivel sistémico como en las mucosas. En los teleósteos, las células B desempeñan un papel central tanto en la inmunidad sistémica como en la de mucosas. Además de producir anticuerpos —principalmente IgM, junto con IgD y el isotipo

especializado IgT, importante en superficies mucosas—, las células B de peces presentan varias características distintivas respecto a los mamíferos: poseen una capacidad fagocítica y microbicida muy activa, comparable a la de las células B1 de mamíferos, con las que comparten múltiples rasgos funcionales (Li et al., 2006). Además, los teleósteos no realizan cambio de isotipo, por lo que la respuesta humoral depende de la expansión y diferenciación de estas mismas poblaciones (Abós et al., 2022). Estas propiedades convierte a los linfocitos B de teleósteos en participantes directos de la inmunidad innata y adaptativa.

Por su parte, los linfocitos T contribuyen mediante funciones colaboradoras y citotóxicas, regulando la producción de anticuerpos y la respuesta efectora tanto en tejidos sistémicos como en las mucosas. En conjunto, B y T forman una red dinámica que sostiene la inmunidad adaptativa en peces y permite respuestas especializadas frente a patógenos tanto en órganos expuestos como la branquia y la pseudobranquia, como en órganos sistémicos. Aunque la organización anatómica del sistema inmune de los peces es más difusa que en vertebrados terrestres, su inmunidad adaptativa está plenamente desarrollada y cumple funciones equivalentes: generar especificidad, modular la respuesta frente a patógenos y establecer memoria inmunológica —aunque en menor medida que otros vertebrados más avanzados— que sustenta la eficacia de la vacunación en acuicultura (Abós et al., 2022).

En peces, los principales órganos inmunitarios se organizan en órganos linfoides primarios y secundarios (**Fig. 1**), con diferencias notables respecto a los mamíferos. El timo es el órgano linfoide primario donde se desarrolla la línea T, mientras que el riñón anterior (o riñón cefálico) cumple la función equivalente a la médula ósea de mamíferos, actuando como el principal sitio de hematopoyesis y maduración de linfocitos B (Bjørgen & Koppang, 2022). Anatómicamente, el riñón de los teleósteos es un órgano alargado y continuo, situado dorsalmente a lo largo de la cavidad corporal, dividido funcionalmente en un riñón anterior de carácter hematopoyético e inmunitario y un riñón posterior con funciones predominantemente excretoras, aunque este último también participa como órgano linfoide secundario. Entre los órganos linfoides secundarios se incluyen además el bazo, donde se producen respuestas adaptativas y se filtra la sangre, y las distintas MALTs. Los órganos linfoides secundarios tienen como función principal facilitar el encuentro entre antígenos y linfocitos, permitiendo así la activación, expansión y maduración de la respuesta inmune adaptativa, esenciales para la defensa frente a patógenos en ambientes acuáticos (Mokhtar, 2021).

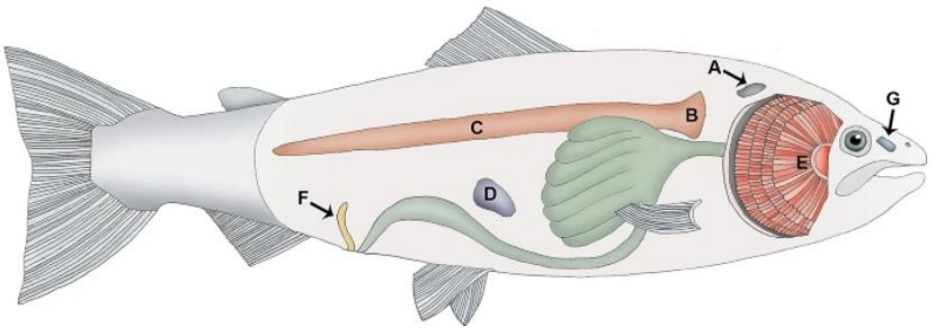


Figura 1. Distribución esquemática de los principales órganos inmunitarios en un teleósteo. Se indican: A, timo; B, riñón cefálico; C, riñón troncal; D, bazo; E, branquias con el tejido linfoide interbranquial (ILT); F, bursa; G, órgano olfatorio asociado al NALT. Adaptado de Bjørgen & Koppang, 2022)

2.3. La branquia:

Las branquias regulan el intercambio de sales y agua y desempeñan un papel esencial en la excreción de los desechos nitrogenados. En la mayoría de los teleósteos, las branquias están formadas por una serie de arcos branquiales con estructura arqueada. Cada arco branquial sostiene hileras de filamentos responsables del transporte sanguíneo hacia y desde las branquias donde se produce el intercambio gaseoso, es decir, la oxigenación de la sangre. El arco está recubierto por un epitelio epidérmico en células mucosas (MCs), que contribuyen a la protección y lubricación. (Wilson & Laurent, 2002).

Las branquias son órganos altamente especializados que, además de su función respiratoria, participan en la osmorregulación, el equilibrio ácido-base y la excreción de amoníaco, pero su epitelio delgado y muy vascularizado las convierte en una de las principales puertas de entrada de patógenos en peces (Evans et al., 2005). Por ello, forman parte del GIALT, donde se han descrito linfocitos B (IgM^+, IgD^+, IgT^+), macrófagos, células dendríticas y linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$. Además, estudios del grupo de Erling Koppang han identificado el ILT (del inglés *Interbranchial Lymphoid Tissue*), una estructura linfoide organizada situada entre los filamentos branquiales donde se acumulan linfocitos T y B —especialmente IgD^+— y que actúa como un microambiente de vigilancia inmunitaria frente a patógenos (Dalum et al., 2015; Koppang et al., 2010). En conjunto, la branquia integra funciones fisiológicas e inmunológicas, actuando como un tejido mucoso altamente expuesto y dotado de mecanismos adaptativos especializados.

2.4. La pseudobranquia:

La pseudobranquia es una estructura epitelial que se localiza detrás del ojo alojado en la cara interna del opérculo, tradicionalmente asociada con la regulación de la presión arterial ocular y con posibles funciones endocrinas (Thiruppathy et al., 2022). Debido a su similitud anatómica con la branquia, se creía que estaba asociada con la respiración en peces. Sin embargo, se descubrió que sólo realizaba dichas funciones respiratorias en las larvas de algunos peces, mas no estaba implicada en la respiración de peces adultos. Su origen en el arco embrionario sigue siendo desconocido, aunque comparte similitud anatómica con los filamentos branquiales y se encuentra en muchos peces con mandíbula. En consecuencia, la pseudobranquia se considera una hemibranquia que ya no participa en el intercambio gaseoso y que recibe directamente sangre oxigenada procedente de la arteria branquial eferente (Tripathi et al., 2025).

2.5. Virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV):

El virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV) es uno de los patógenos virales más relevantes en acuicultura, especialmente en salmónidos, donde provoca elevadas mortalidades y pérdidas económicas significativas. Se trata de un *Rhabdovirus* que infecta preferentemente tejidos hematopoyéticos y endoteliales, desencadenando septicemia, alteraciones en la osmorregulación y un marcado compromiso inmunitario (Dixon et al., 2016). Debido a su impacto sanitario y económico, IHNV es un patógeno de declaración obligatoria en la Unión Europea y en España, estando incluido en la lista de enfermedades de declaración obligatoria para animales acuáticos según el Reglamento (UE) 2016/429 (“Ley de Sanidad Animal”) y su transposición al marco nacional (BOE, Real Decreto 638/2019). Esta clasificación implica que cualquier detección del virus en explotaciones acuícolas debe ser notificada a la autoridad competente, activando medidas de vigilancia y control para evitar su diseminación.

La entrada del virus ocurre principalmente a través de superficies mucosas expuestas, como la base de las aletas, las branquias y cavidad oronasal, lo que lo convierte en un modelo ideal para estudiar la inmunidad mucosal en peces. En particular, las branquias representan una puerta de entrada crítica debido a su elevada vascularización y contacto directo con el agua, y constituyen uno de los primeros tejidos donde se detecta replicación viral y activación

de respuestas innatas y adaptativas. Además de su afinidad por tejidos hematopoyéticos y endoteliales, IHNV presenta también tropismo por el sistema nervioso central, especialmente por el cerebro y la médula espinal, donde puede causar lesiones neurológicas características en fases avanzadas de la infección (Páez et al., 2020). Estudios recientes han demostrado que IHNV induce una fuerte respuesta antiviral mediada por interferones (IFNs) tipo I, células T citotóxicas y producción de Igs, pero la magnitud y cinética de estas respuestas varían entre órganos y etapas de desarrollo (Shao et al., 2022).

En este contexto, la pseudobranquia emerge como un órgano de especial interés. Aunque anatómicamente cercana a la branquia y situada en la misma región opercular, no está en contacto directo con el agua, sino protegida bajo el opérculo. Su función inmunológica permanece prácticamente desconocida. No se sabe si actúa como un tejido linfoide, si participa en la vigilancia inmunitaria local o si contribuye a la respuesta antiviral frente a patógenos como IHNV. Dado que este virus utiliza rutas mucosas para infectar al hospedador y que la pseudobranquia comparte características estructurales con otros tejidos mucosos, resulta plausible que desempeñe un papel inmunitario aún no descrito. Comprender cómo responde este órgano frente a IHNV no solo permitirá aclarar su naturaleza inmunológica, sino que también podría revelar nuevas rutas de entrada viral, identificar tejidos son funciones inmunes previamente no caracterizados y contribuir al diseño de estrategias vacunales más eficaces en acuicultura. Por ello, los experimentos presentados en este trabajo se centran en caracterizar la respuesta de la pseudobranquia frente a IHNV y compararla con la de la branquia, con el objetivo de determinar si este tejido participa activamente en la defensa antiviral.

Este trabajo también se enmarca dentro de las tres dimensiones de la sostenibilidad —ambiental, social y económica— recogidas en la Agenda 2030 (Pacto Mundial Red Española, 2026). Desde una perspectiva ambiental, la mejora del conocimiento sobre la inmunidad de peces cultivados contribuye al ODS 14 (Vida submarina) al favorecer prácticas acuícolas que reduzcan el impacto ecológico y promuevan ecosistemas acuáticos más resilientes. En el plano social, el fortalecimiento de la salud de los peces mediante estrategias preventivas se alinea con el ODS 3 (Salud y bienestar), al disminuir la necesidad de tratamientos farmacológicos y mejorar el bienestar animal, un aspecto cada vez más demandado por la sociedad. Finalmente, desde la dimensión económica, una acuicultura más eficiente y menos

dependiente de antibióticos contribuye al ODS 2 (Hambre cero) y al ODS 12 (Producción y consumo responsables), al garantizar una producción estable de proteína de alta calidad con menor coste sanitario y menor riesgo de pérdidas por brotes infecciosos.

3. Hipotesis

La pseudobranquia constituye un órgano inmunitario funcional que contiene poblaciones linfocitarias con capacidad de responder frente a la infección por IHNV.

4. Objetivos

4.1. Objetivos generales

- Caracterizar las poblaciones linfocitarias presentes en la pseudobranquia de peces.
- Evaluar la respuesta inmunitaria de la pseudobranquia frente al IHNV.

4.2. Objetivos específicos

- Identificar y cuantificar las poblaciones de linfocitos B y T presentes en la pseudobranquia de peces mediante técnicas histológicas y citométricas.
- Analizar los cambios en la distribución, abundancia y la activación inmunitaria evaluada de forma indirecta mediante expresión génica en la pseudobranquia tras la exposición al IHNV.
- Determinar la expresión de genes inmunes clave en la pseudobranquia en condiciones basales y tras infección.

5. Metodología

5.1. Diseño experimental

Un resumen de las metodologías empleadas, así como del diseño experimental de este trabajo está ilustrado en la **Fig. 2.**

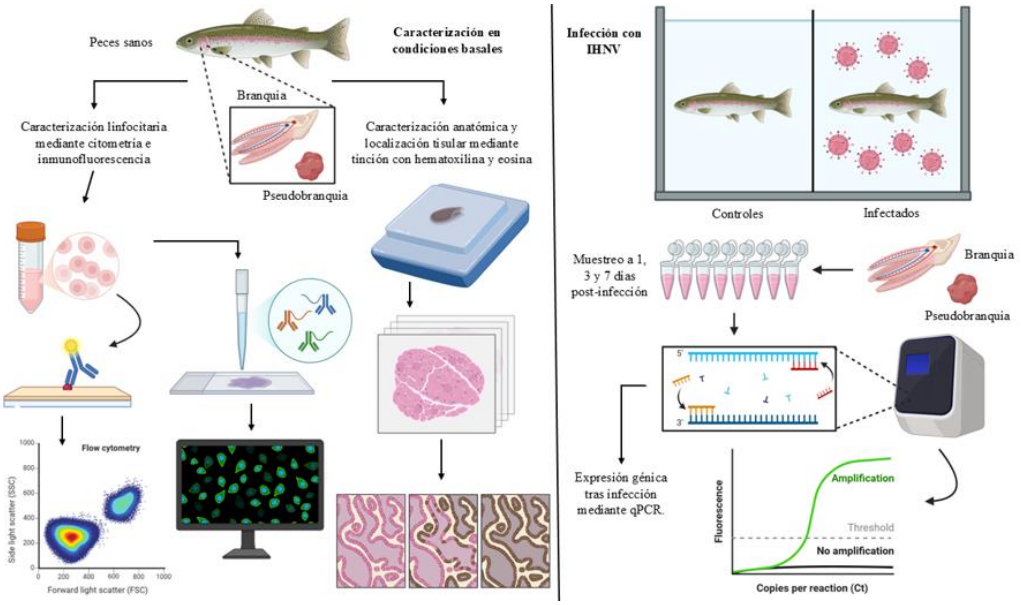


Figura 2. Diseño experimental del estudio. El esquema resume las aproximaciones metodológicas empleadas para caracterizar la respuesta inmunitaria en branquia y pseudobranquia en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). En condiciones basales (izquierda), se realizó la caracterización linfocitaria mediante citometría de flujo e inmunofluorescencia a partir de células obtenidas de ambos órganos, así como la caracterización anatómica tisular en branquia y pseudobranquia mediante tinción con hematoxilina y eosina. En paralelo (derecha), se llevó a cabo la infección experimental con IHNV, incluyendo grupos control e infectados, con muestreos a 1, 3 y 7 días post-infección. Las branquias y pseudobranquias obtenidas tras la infección se emplearon para el análisis de expresión génica mediante qPCR a tiempo real, permitiendo evaluar la respuesta antiviral en estos tejidos.

5.2. Condiciones de cultivo de los peces

Las truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) empleadas en este estudio fueron hembras juveniles de 15-20 gramos, procedentes de una piscifactoría nacional (Piscifactoría Felechosa, Asturias), que fueron trasladadas a las instalaciones del INIA (Instituto Nacional de Investigación de Tecnología Agraria y Alimentaria), donde se mantuvieron durante todo el estudio. Los peces se alojaron en tanques de 30 litros equipados con sistema de recirculación y filtración biológica externa, aireación constante y un fotoperiodo controlado de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. La temperatura del agua se mantuvo estable a 14ºC. La alimentación consistió en un pienso comercial (Skretting, Stavanger, Noruega), administrado dos veces al día.

Antes de iniciar cualquier procedimiento experimental, los animales permanecieron en fase de aclimatación durante un mínimo de dos semanas bajo las condiciones descritas. Durante este periodo no se detectaron alteraciones clínicas ni comportamientos anómalos. Todas las

actuaciones con animales se llevaron a cabo siguiendo la normativa europea vigente para el uso de animales de experimentación (Directiva 2010/63/UE) y contaron con la aprobación del Comité de Ética del INIA (código PROEX 065.3/21). Se aplicaron medidas destinadas a reducir al máximo cualquier posible malestar o sufrimiento (Simón et al., 2026).

5.3. Análisis histológico

Las muestras de branquia y pseudobranquia procedentes de peces sanos fueron fijadas en paraformaldehido 4% durante 24-48 h, deshidratadas mediante los protocolos histológicos estándar e incluidas en parafina. De cada órgano se obtuvieron cortes de 3.5 µm de grosor. Para la evaluación de la organización tisular de pseudobranquia, los cortes fueron desparafinados y rehidratados con baños consecutivos de xilol y etanol, siguiendo los protocolos estándar antes de ser teñidos con hematoxilina y eosina (H&E). Asimismo, se analizaron secciones de branquia con fines comparativos. El análisis microscópico permitió describir la arquitectura lamelar, el epitelio y las estructuras internas características de cada tejido. Las observaciones se realizaron mediante microscopía óptica de campo claro, y las imágenes se capturaron con una cámara digital acoplada al microscopio.

5.4. Obtención de leucocitos de branquia y pseudobranquia

Las truchas arcoíris se sacrificaron mediante una sobredosis de benzocaína (Sigma). Tras la eutanasia, se procedió a la extracción de las branquias y pseudobranquias para su posterior procesamiento. Los tejidos se colocaron inmediatamente en medio Leibovitz (L-15, Thermo Fisher Scientific) suplementado con penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 µg/mL), suero fetal bovino (FBS) al 2% y heparina (10 UI/mL). Para obtener suspensiones celulares individuales, tanto las branquias como las pseudobranquias se desmenuzaron cuidadosamente sobre filtros de nailon de 100 µm (BD Biosciences) utilizando medio L-15 suplementado con antibióticos, 2% FBS y heparina. Las suspensiones resultantes se cargaron sobre gradientes discontinuos de Percoll al 30% y 51% (GE Healthcare).

Los gradientes se centrifugaron a 526 × g durante 30 min a 4°C. Tras la centrifugación, se recuperó la fracción situada en la interfase, correspondiente a la población celular de interés. Las células se lavaron con medio L-15 suplementado con antibióticos y 5% FBS, y finalmente se ajustaron a una concentración de 2×10^6 células/mL (Simón et al., 2019).

5.5. Caracterización linfocitaria en branquias y pseudobranquia mediante citometría de flujo

Los leucocitos obtenidos de branquia y pseudobranquia se analizaron mediante citometría de flujo. Para ello, las células se incubaron con anticuerpos monoclonales (mAbs) específicos frente a Igs de trucha (IgM e IgD), así como con anticuerpos dirigidos contra marcadores de linfocitos T (CD4 y CD8). Se utilizaron dos anticuerpos de rata que reconocen específicamente linfocitos T de trucha. El primero, mAb4/8, es de producción reciente y detecta tanto linfocitos T $CD4^+$ como $CD8^+$. El segundo, α-CD8, reconoce exclusivamente linfocitos T $CD8^+$. Al combinarlos, es posible distinguir y obtener ambas poblaciones de linfocitos T ($CD4^+$ y $CD8^+$). Cada anticuerpo se diluyó en *staining buffer* (medio L-15 sin rojo fenol suplementado con 2% FBS) y las muestras se mantuvieron en oscuridad durante 1 h a 4 °C. Estos anticuerpos son propios del laboratorio de investigación.

Los anticuerpos frente a IgM e IgD estaban conjugados con fluorocromos apropiados para su detección (Vicente-Gil et al., 2025), mientras que los anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 se utilizaron sin conjugar. Tras varios lavados, y en los casos que correspondía, las células se incubaron con anticuerpos secundarios anti-rat IgM en FITC y anti-rat IgG en PE (Thermo Fisher Scientific) para visualizar linfocitos T. Todos los anticuerpos fueron utilizados a una concentración final de 1 µg/ml. Para verificar la especificidad de las uniones, se incluyeron controles con isotipos de ratón y rata (Biolegend) conjugados con los mismos fluorocromos utilizados en los anticuerpos experimentales.

Tras el marcaje, las células se lavaron dos veces con *staining buffer* y se resuspendieron en el mismo medio para su adquisición en un citómetro BD FACS Celesta, utilizando el software BD FACSDiva. Durante el análisis, se excluyeron agregados celulares y células muertas siguiendo la estrategia de compuertas establecida para este estudio. La viabilidad celular se evaluó mediante tinción con DAPI (0.2 µg/ml). Los datos obtenidos se procesaron y representaron utilizando el software FlowJo® v10.

5.6. Inmunofluorescencia

Los leucocitos obtenidos de pseudobranquia y branquia según el procedimiento descrito previamente, se sembraron sobre portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina (0.01%, Sigma-

Aldrich) y se dejaron adherir durante 1 h a temperatura ambiente en una cámara húmeda. A continuación, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 min y posteriormente se incubaron durante 1 h con una disolución bloqueante compuesta por TBS con un 5% de BSA y 0.5% saponina. Todos los pasos de incubación posteriores se realizaron durante 1 h a temperatura ambiente en condiciones de humedad controlada.

Tras el bloqueo, las células se incubaron con los anticuerpos específicos dirigidos frente a los linfocitos T, concretamente mAb4/8 (10 µg/ml) y su anticuerpo secundario en FITC (2 µg/ml) y α-CD8 (10 µg/ml) y su anticuerpo secundario en AF633 (3 µg/ml), con el fin de identificar y caracterizar las subpoblaciones T presentes en este tejido. Se incluyeron controles isotipo correspondientes (Isotipo IgM de rata e isotipo IgG de rata) con el objetivo de evaluar la señal inespecífica asociada a los fluorocromos y establecer los límites de detección para los marcajes posteriores. Una vez completada la tinción, todas las muestras se contratiñeron con DAPI (1 µg/ml, Sigma-Aldrich) durante 10 min a temperatura ambiente, se lavaron con PBS 1X y se montaron con Fluoromount (Sigma-Aldrich) para su visualización microscópica. Las imágenes se adquirieron mediante microscopía confocal de barrido láser utilizando un sistema Zeiss Axiovert LSM 880 y el software Zeiss Zen. El procesamiento y ajuste final de las imágenes se realizó con Zeiss Zen y Adobe Photoshop CS6. (Vicente-Gil et al., 2025).

5.7. Infección de los peces con IHNV

El experimento se desarrolló siguiendo la normativa europea para el uso de animales con fines científicos (Directiva 2010/63/UE) y todas las manipulaciones fueron realizadas por personal formado en procedimientos experimentales con peces.

Se emplearon 60 juveniles de trucha arcoíris, que fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos experimentales: 30 peces destinados a la infección con IHNV y 30 peces control no infectados. Para ello, tras un periodo de aclimatación, los peces infectados fueron expuestos por inmersión durante 1 h, con fuerte aireación, a una suspensión de IHNV 32-87 propagado en células adherentes de epitelioma de Cyprini (EPC) (Kinkelin et al.,1987) a una concentración de 1 x 10^5 $TCID_{50}$/mL. El grupo control fue sometido al mismo procedimiento de baño, pero sin presencia del virus.

Para evaluar la cinética de la infección, se muestrearon 7 peces por condición (infectados y controles) en tres momentos experimentales: 1, 3 y 7 días post-infección (dpi). Los peces se sacrificaron mediante una sobredosis de benzocaína (Sigma), siguiendo las recomendaciones para eutanasia en peces teleósteos. Los tejidos seleccionados para el estudio fueron branquias y pseudobranquia, que se extrajeron inmediatamente tras la eutanasia y posteriormente se conservaron a -80ºC para la cuantificación de carga viral (Vaz et al., 2025).

5.8. Aislamiento de ARN y análisis qPCR

El ARN total de branquia y pseudobranquia se aisló, empleando la solución TRI Reagent™, siguiendo las indicaciones proporcionadas por el fabricante (Simón et al., 2026). Una vez extraído, el ARN se cuantificó mediante un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). Para evitar la presencia de ADN genómico residual que pudiera interferir en los análisis posteriores, las muestras se trataron con DNAsa utilizando el kit Out DNA Removal (Thermo Scientific). Posteriormente, el ARN purificado se retrotranscribió a cDNA empleando un kit de síntesis de primera cadena, que se utilizó como molde para los análisis de expresión génica mediante qPCR.

5.9. Evaluación de la expresión de genes inmunitarios mediante PCR en tiempo real.

La cuantificación de la transcripción de los genes asociados a la respuesta antiviral se llevó a cabo mediante PCR a tiempo real utilizando un sistema LightCycler® 96 (Roche) y el reactivo FastStart Essential DNA Green Master (Roche). Para cada gen se emplearon cebadores específicos previamente optimizados (**Tabla S1**). Cada muestra se analizó por duplicado siguiendo el siguiente programa de amplificación: desnaturalización inicial de 10 min a 95 °C, seguida de 40 ciclos compuestos por 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C. La expresión relativa de cada gen se normalizó frente al gen constitutivo β-actina, previamente utilizado en trucha (Simón et al., 2026). Los niveles de expresión se calcularon mediante el método $2^{-}\Delta Ct$, donde ΔCt corresponde a la diferencia entre el Ct del gen diana y el Ct del gen de referencia (umbral de Ct establecido en 38). En todas las reacciones se incluyeron controles negativos sin transcriptasa inversa para descartar contaminaciones o amplificaciones no específicas.

5.10. Análisis estadístico

El tratamiento y análisis de los datos se realizó con el software GraphPad Prism (v8.0.1, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Antes de aplicar las pruebas estadísticas, se comprobó la normalidad de las distribuciones mediante el test de Shapiro-Wilk. Cuando los datos mostraron una distribución normal, se emplearon pruebas t-student en formato pareado o no pareado según correspondiera. En aquellos casos en los que los datos no cumplían el criterio de normalidad, se utilizaron pruebas no paramétricas como Mann-Whitney para comparaciones entre grupos independientes. Dado que el objetivo del estudio era comparar la respuesta frente a la infección dentro de cada tejido por separado, los análisis se realizaron únicamente entre dos grupos por tejido (control vs infectado), sin comparaciones cruzadas entre órganos.

6. Resultados

6.1. Caracterización histológica de pseudobranquia y branquia (Hematoxilina–Eosina).

6.1.1. Morfología general de la pseudobranquia

La pseudobranquia de la trucha arcoíris se organiza en filamentos pseudobranquiales, septos membranosos y un estroma interno con cartílago y células especializadas (**Fig. 3**). Al igual que en la branquia, en la lámina propia de la pseudobranquia se observan células pequeñas cuyo núcleo ocupa la mayor parte del citoplasma y que muestran una tinción intensamente basófila con H&E. Estas células probablemente corresponden a linfocitos, cuya presencia resulta especialmente relevante para la interpretación de los resultados de este estudio.

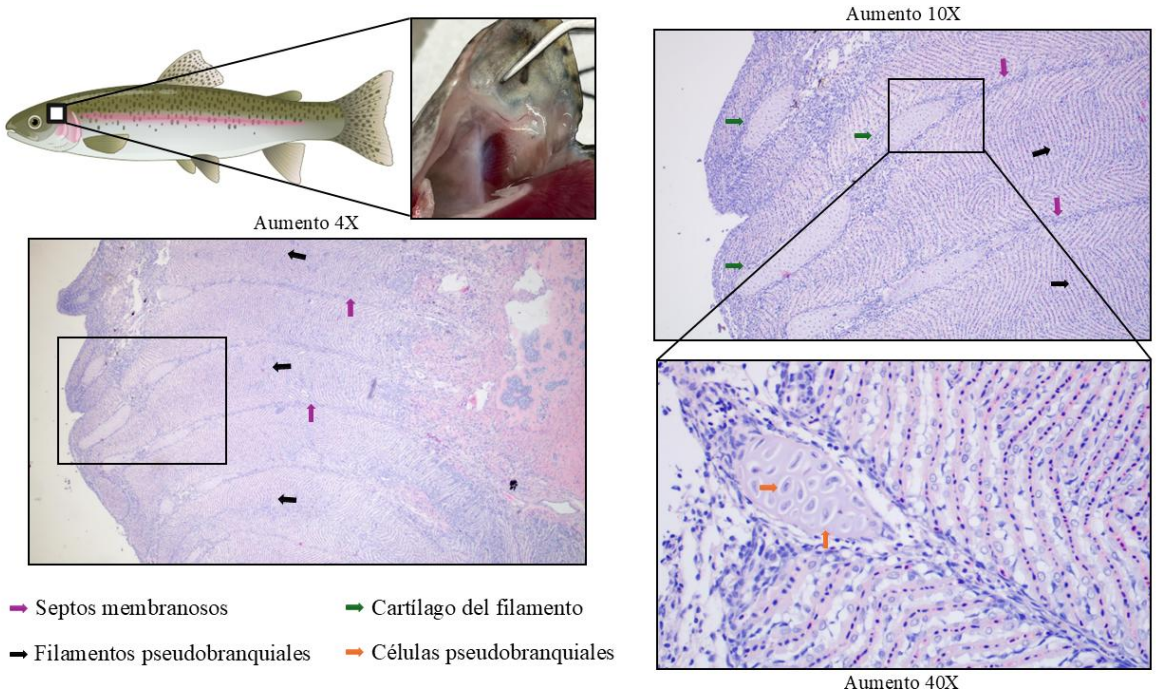


Figura 3. Histología de pseudobranquia teñida con hematoxilina–eosina a diferentes aumentos. Estructura histológica de la pseudobranquia de trucha arcoíris observada a diferentes aumentos. A 4× se aprecia la organización general del tejido, con filamentos pseudobranquiales (flechas negras) y septos membranosos (flechas moradas). A 10× se distinguen con mayor detalle los filamentos y el cartílago asociado (flechas verdes). A 40× se observan las células pseudobranquiales (flechas naranjas), evidenciando la arquitectura celular característica de este órgano.

6.1.2. Morfología general de la branquia

La branquia presenta una estructura fina y muy vascularizada (**Fig. 4**). En el interior del filamento, la lámina propia alberga una variedad de leucocitos, incluidos macrófagos, linfocitos y células presentadoras de antígeno que en ocasiones pueden localizarse también esparcidas en las lamelas (**Fig. 4**). Por ello, además de su papel respiratorio, la branquia constituye un importante tejido inmunológico, relevante para interpretar los resultados obtenidos en este estudio.

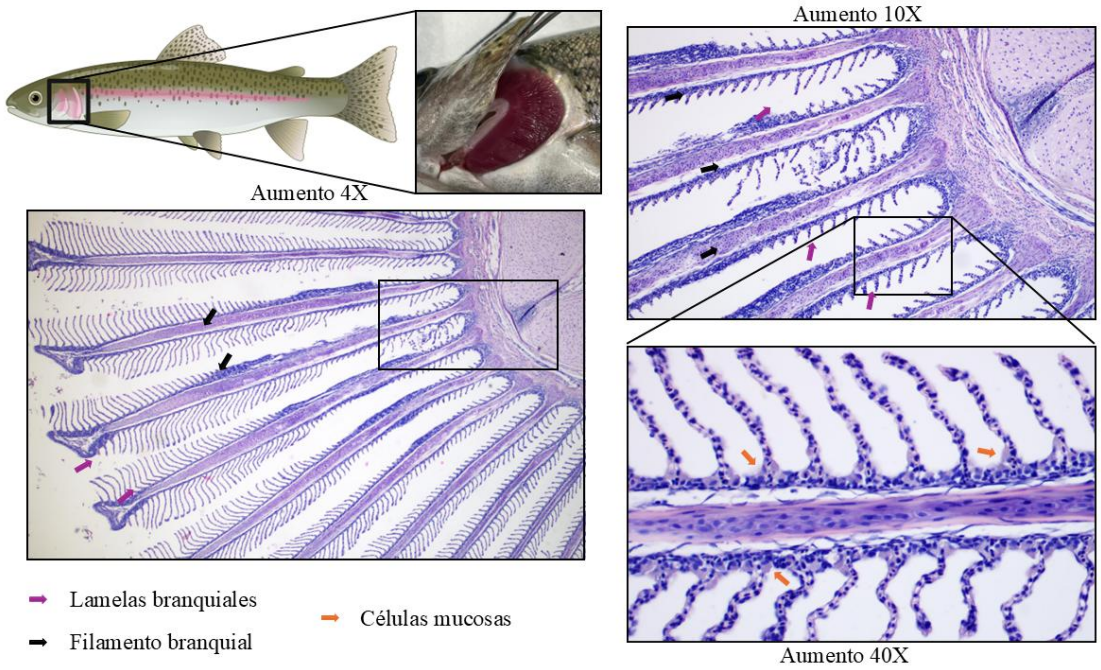


Figura 4. Histología de branquia teñida con hematoxilina–eosina a diferentes aumentos. Estructura histológica de la branquia de trucha arcoíris observada a diferentes aumentos. A 4× y 10× se aprecia la organización general del órgano, con los filamentos branquiales primarios (flechas negras) y las láminas secundarias o lamelas (flechas moradas). A 10× se distinguen la disposición de las lamelas. A 40× se observan las células mucosas (flechas naranjas) y la arquitectura celular fina de las superficies respiratorias donde se intercalan los leucocitos.

6.2. Caracterización de la población linfocitaria en branquia y pseudobranquia de trucha

6.2.1. Citometría de flujo

Para la caracterización de las poblaciones linfocitarias presentes en branquia y pseudobranquia se emplearon anticuerpos monoclonales utilizados de forma rutinaria en el laboratorio. Estos permitieron identificar linfocitos B, más específicamente poblaciones diferenciadas que expresan únicamente IgM en su membrana (IgM^+ only) o IgD (IgD^+ only), y poblaciones que presentan ambas Ig en su membrana (IgM^+-IgD^+) consideradas como células B naive (**Fig. 5**). La pseudobranquia presenta un porcentaje relativamente mayor de células B y una proporción más elevada de células dobles positivas (IgM^+IgD^+) comparado con la branquia (**Fig. 5**).

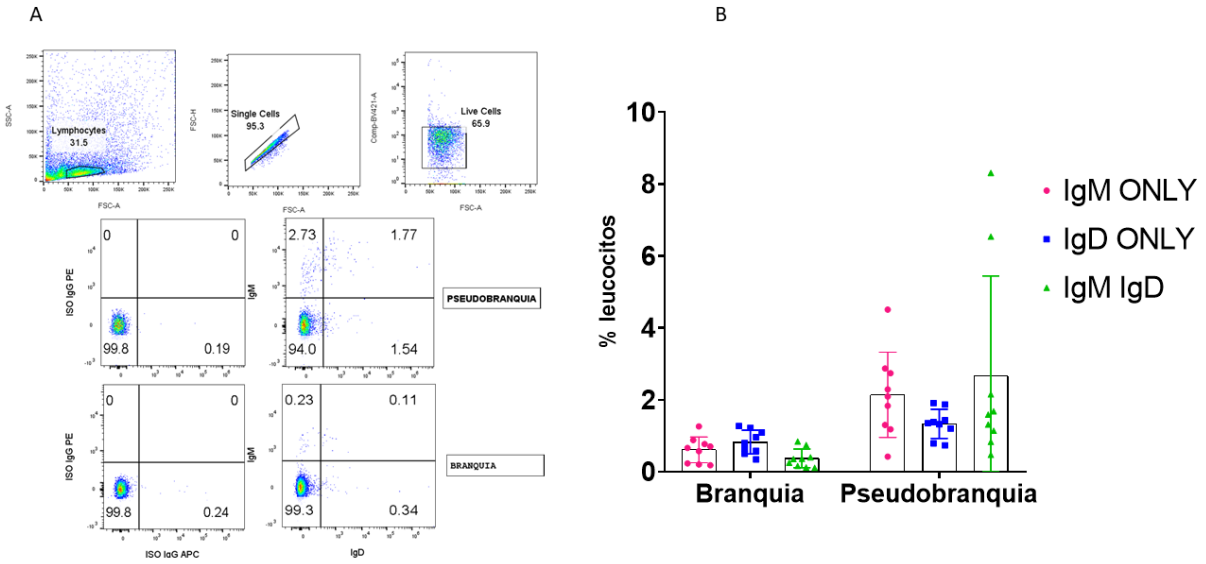


Figura 5. Caracterización de las poblaciones de linfocitos B en branquia y pseudobranquia mediante citometría de flujo. (A) Dot plots representativos que muestran la estrategia de selección celular (linfocitos, células simples y células viables) y la distribución de las subpoblaciones B según la expresión de IgM e IgD. (B) Porcentajes de linfocitos B IgM-only, IgD-only e $IgM^{+}IgD^{+}$ en ambos tejidos (N = 9).

La distribución de las principales poblaciones de linfocitos T; T colaboradoras ($CD4^{+}$) y T citotóxicas ($CD8^{+}$) en branquia y pseudobranquia se muestran en **Fig. 6**. Tanto las $CD4^{+}$ como las $CD8^{+}$ están presentes en los dos órganos, aunque con proporciones significativamente mayores en branquia, confirmando que la pseudobranquia alberga un repertorio T definido pero cuantitativamente distinto al de la branquia (**Fig. 6**).

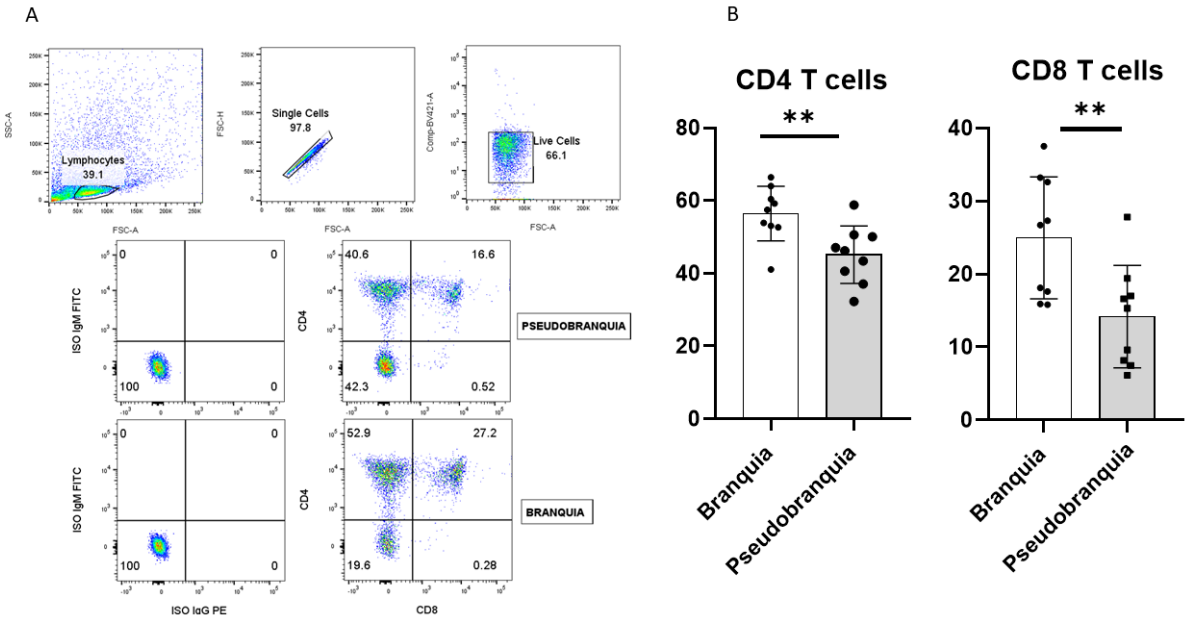


Figura 6. Caracterización de las poblaciones de linfocitos T en branquia y pseudobranquia mediante citometría de flujo. (A) Dot plots representativos que muestran la estrategia de selección celular (linfocitos, células simples y células viables), los controles isotipo y la distribución de las subpoblaciones T según la expresión de CD4 y CD8 en ambos tejidos. (B) Porcentaje de linfocitos $CD4^+$ y $CD8^+$ en branquia y pseudobranquia (N = 9).

Al comparar la distribución global de linfocitos en estos órganos mucosos, se observa que los linfocitos T constituyen la población predominante tanto en branquia como en pseudobranquia, mientras que los linfocitos B representan solo una fracción minoritaria. En branquia, los linfocitos T alcanzan valores aproximados del 52–60% para $CD4^+$ y 25–30% para $CD8^+$, frente a un ~1% de linfocitos B totales (IgM-only, IgD-only e IgM^+IgD^+). De forma similar, en pseudobranquia los linfocitos T representan alrededor del 40–45% ($CD4^+$) y 15–20% ($CD8^+$), mientras que los linfocitos B suponen únicamente ~3–4% del total. En conjunto, estos resultados confirman que ambos órganos están dominados por poblaciones T, lo que concuerda con su papel como tejidos mucosos altamente expuestos y dependientes de la inmunidad celular para la vigilancia inmunitaria.

6.2.2. Inmunofluorescencia

En concordancia con los resultados obtenidos por citometría de flujo, el análisis por inmunofluorescencia confocal confirmó la presencia de linfocitos T en la pseudobranquia de la trucha arcoíris (**Fig. 7**). Las células marcadas con mAb4/8 (FITC, verde) y α-CD8 (AF633, rojo) permitieron distinguir claramente ambas subpoblaciones: las células $CD4^+$ aparecieron como señales verdes aisladas, mientras que las células $CD8^+$ se identificaron como señales dobles positivas verde-rojo. Aunque esta técnica es semi-cuantitativa, el patrón es consistente con la distribución típica de linfocitos T colaboradores y citotóxicos descrita en otros tejidos mucosos de teleósteos, y proporciona evidencia visual directa de que la pseudobranquia alberga un repertorio T funcional.

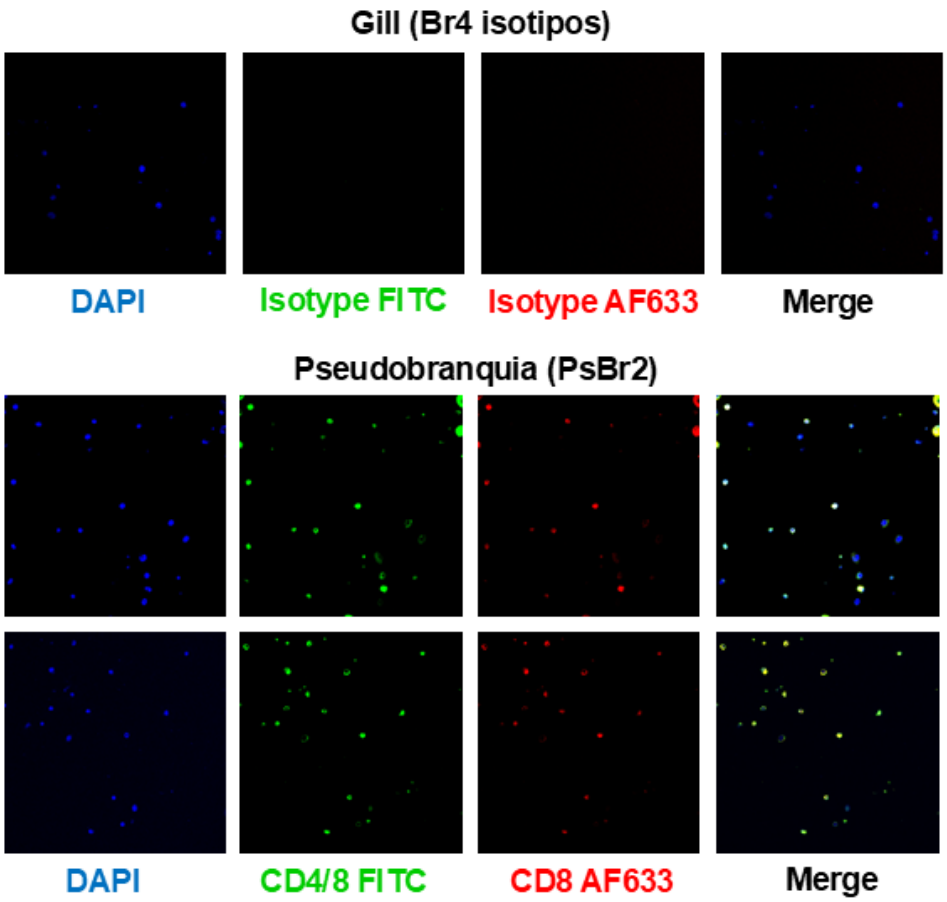


Figura 7. Inmunofluorescencia confocal. Leucocitos de pseudobranquia (panel inferior) marcados con α-CD4 (verde, FITC) y α-CD8 (rojo, AF633) mAbs. Las células verdes corresponden a linfocitos $CD4^+$, mientras que las células dobles positivas verde-rojo representan linfocitos $CD8^+$. Los núcleos celulares se ven en azul (DAPI). Los isotipos correspondientes (control negativo) se muestran en tejido de branquia (panel superior).

6.3. Modulación génica de la respuesta de linfocitos T y B frente a una infección con IHNV.

Tras analizar la carga viral de IHNV (**Fig. 8**) y la respuesta antiviral temprana de IFN- γ en branquia y pseudobranquia (**Fig. 9**), se observó que ambos tejidos presentan infección detectable desde 1 dpi, con un incremento claro de la respuesta interferón en los días posteriores. La comparación entre 3 dpi y 7 dpi mostró que, aunque en 3 dpi ya existe activación inmune, es en 7 dpi cuando se alcanza una respuesta más robusta y diferenciada entre tejidos, lo que permite caracterizar con mayor claridad los mecanismos inmunitarios implicados. Por este motivo, el análisis detallado de la respuesta adaptativa —incluyendo la expresión de marcadores de linfocitos T y B— se centró en 7 dpi (**Fig. 10 y 11**).

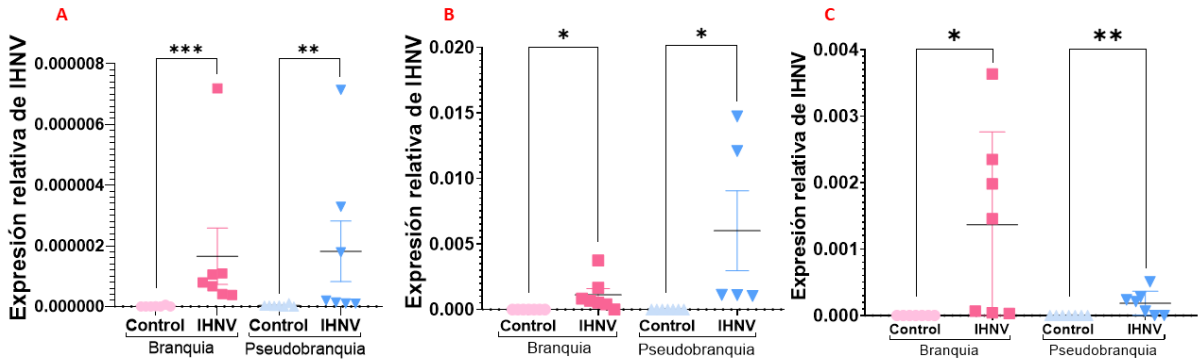


Figura 8. Expresión relativa del virus IHNV en branquia y pseudobranquia a lo largo de la infección. (A) 1 dpi, **(B)** 3 dpi y **(C)** 7 dpi. N=7. Se utilizó t de Student (paramétrico) o Mann-Whitney (no paramétrico) para medir las significancias entre grupos independientes. *, **, *** corresponden a valores de significancia (*p* values) de <0.05, <0.01, <0.001 respectivamente.

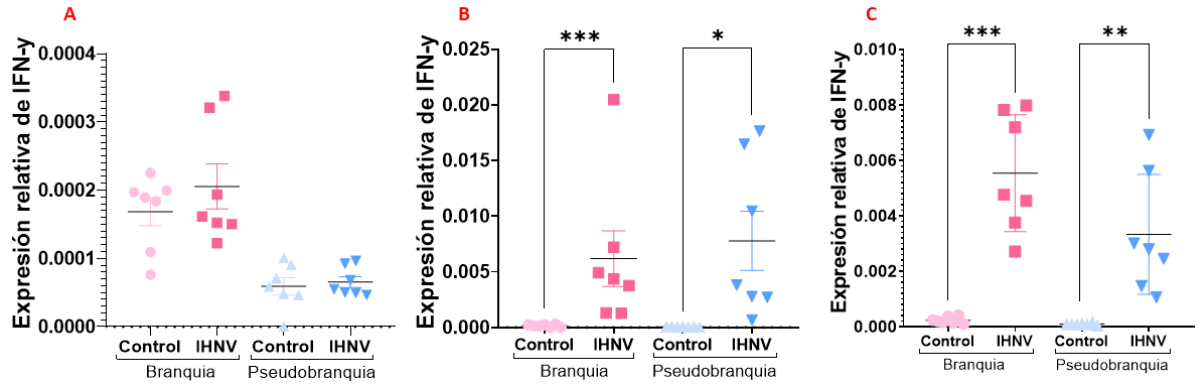


Figura 9. Expresión relativa de IFN-γ en branquia y pseudobranquia durante la infección por IHNV. (A) 1 dpi, **(B)** 3 dpi y **(C)** 7 dpi. N=7. Se utilizó *t* de Student (paramétrico) o Mann-Whitney (no paramétrico) para medir las significancias entre grupos independientes. *, **, *** corresponden a valores de significancia (*p* values) de <0.05, <0.01, <0.001 respectivamente.

A 1 dpi, la expresión de IFN-γ no mostró diferencias significativas entre peces control e infectados en ninguno de los tejidos. En contraste, la carga viral de IHNV sí fue claramente detectable en los peces infectados, con valores prácticamente nulos en los controles. Las diferencias fueron altamente significativas tanto en branquia (Mann–Whitney, $p = 0.0006$) como en pseudobranquia (Mann-Whitney, $p = 0.0023$). Estos resultados indican que la infección está establecida desde el primer día, aunque la respuesta antiviral aún no se ha activado (**Fig. 8A y Fig. 9A**).

A 3 dpi se observa una inducción significativa de IFN-γ en ambos tejidos (**Fig. 9B**). En branquia, los peces infectados presentan un aumento marcado (Mann–Whitney, $p = 0.0006$), mientras que en pseudobranquia también se detecta una elevación significativa (t-test, $p = 0.0132$), con un tamaño del efecto moderado-alto. Paralelamente, la carga viral de IHNV es elevada y exclusiva de los peces infectados (**Fig. 8B**. En conjunto, estos resultados indican que a 3 dpi la infección está plenamente establecida y la respuesta antiviral ya ha comenzado, aunque todavía en una fase temprana.

A 7 dpi, IFN-γ mostró una fuerte inducción en ambos tejidos de los peces infectados (*t*-test, $p < 0.002$) (**Fig. 9C**). Estos resultados indican una activación antiviral robusta y sostenida en esta fase de la infección. La detección de IHNV mostró un patrón consistente entre ambos órganos, con presencia viral únicamente en los peces infectados (**Fig. 8C**). En conjunto, estos datos confirman que la infección sigue activa a 7 dpi, aunque con niveles virales más bajos que en fases tempranas.

Como a 3dpi la repuesta frente a la infección de IHNV parecía más bien temprana, se eligió 7 dpi para analizar la expresión de genes relacionados con linfocitos T y linfocitos B, ya que en un estadio más tardío de la infección se espera mayor modulación de elementos inmunes propios del sistema inmune adaptativo. A 7dpi, CD4-1 mostró una inducción marcada en los peces infectados de branquia y pseudobranquia (*t*-test, $p < 0.0001$ y Mann-Whitney, $p = 0.0041$, respectivamente) (**Fig. 10**), indicando una activación robusta de linfocitos T helper en esta fase de la infección. En contraste, CD8-α se mantuvo estable tanto en branquia como en pseudobranquia, sin diferencias significativas entre peces control e infectados (t-test, $p = 0.5254$; Mann-Whitney, $p = 0.2074$) (**Fig. 10**).

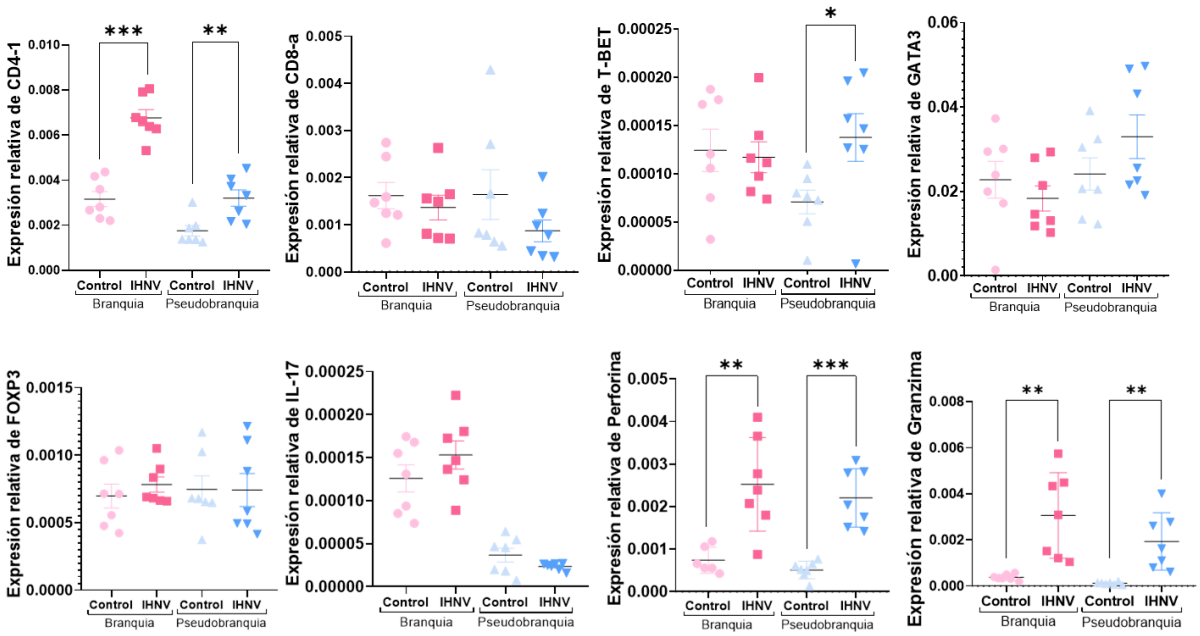


Figura 10. Expresión relativa de genes asociados a linfocitos T en branquia y pseudobranquia a 7 días post-infección (7 dpi). N=7. Se utilizó t de Student (paramétrico) o Mann-Whitney (no paramétrico) para medir las significancias entre grupos independientes. *, **, *** corresponden a valores de significancia (p values) de <0.05, <0.01, <0.001 respectivamente.

Además de CD4-1 y CD8-α que son los genes marcadores de las 2 sub-poblaciones principales de linfocitos T (Th y Tc), se analizaron otros genes que modulan la respuesta efectora de ambas poblaciones. En la ruta Th1/Th2, T-BET mostró un patrón diferencial entre tejidos: en branquia no se detectaron diferencias entre peces control e infectados (*t*-test, $p = 0.7965$), mientras que en pseudobranquia se observó un aumento significativo (*t*-test, $p = 0.0325$), indicando una activación localizada de la vía Th1; por el contrario, GATA3 permaneció estable en ambos órganos (branquia: *t*-test, $p = 0.4220$; pseudobranquia: *t*-test, $p = 0.1964$), sin evidencia de modulación de la vía Th2. En la ruta T reguladora la ruta Th17, tanto FOXP3 como IL-17 se mantuvieron sin cambios relevantes: FOXP3 no mostró diferencias en branquia (t-test, $p = 0.4318$) ni en pseudobranquia (t-test, $p = 0.9712$), mientras que IL-17 presentó solo ligeras tendencias no significativas (branquia: *t*-test, $p = 0.253$; pseudobranquia: *t*-test, $p = 0.1340$), indicando ausencia de activación de poblaciones T reguladoras o Th17 a 7 dpi. En contraste, los genes de la ruta citotóxica mostraron una activación muy marcada: perforina aumentó significativamente en branquia (*t*-test, $p = 0.0029$) y de forma aún más intensa en pseudobranquia (*t*-test, $p < 0.0001$), mientras que granzima presentó incrementos significativos en ambos tejidos (branquia: *t*-test, $p = 0.0025$;

pseudobranquia: *t*-test, $p = 0.0022$). En conjunto, estos resultados indican que, a 7 dpi, no se modulan las rutas Th2, Treg ni Th17, mientras que la respuesta Th1 y, especialmente, la actividad citotóxica se encuentra claramente activadas, con una intensidad mayor en pseudobranquia (**Fig. 10**).

En cuanto al panel de genes marcadores de linfocitos B (**Fig. 11**), IgM secretada (IgM Sec) mostró un patrón claramente diferenciado entre tejidos. En branquia no se detectaron diferencias entre grupos (*t*-test, $p = 0.2967$), manteniéndose niveles estables. En pseudobranquia, se observó un incremento significativo en los peces infectados (Mann-Whitney, $p = 0.0350$), indicando una respuesta humoral activa en esta fase de la infección. En cuanto a IgM de membrana (IgM Mb), en branquia se registró un aumento significativo en los peces infectados (*t*-test, $p = 0.0120$), lo que sugiere una activación de células B en este tejido. En pseudobranquia, por el contrario, no hubo diferencias significativas (Mann-Whitney, $p = 0.1649$). En cuanto a IgT, ambas formas, tanto la secretada (IgT Sec) como de membrana (IgT Mb) se mantuvieron constantes en ambos tejidos, indicando que IgT no experimenta una modulación detectable a 7 dpi lo que sugiere una ausencia de activación en esta fase de la infección.

Por último, IgD secretada (IgD Sec) mostró un patrón diferenciado entre tejidos; en branquia se observó un incremento significativo en los peces infectados (*t*-test, $p = 0.0112$), indicando una activación humoral en esta fase de la infección. En pseudobranquia, en cambio, no se detectaron diferencias significativas (Mann-Whitney, $p = 0.1014$), aunque con un claro patrón al alza en infectados vs. control. De forma similar, IgD de membrana (IgD Mb) muestra un patrón al alza en los peces infectados vs. control aunque sin diferencias estadísticamente significativas (branquia: *t*-test, $p = 0.1430$, y en pseudobranquia: *t*-test, $p = 0.1173$).

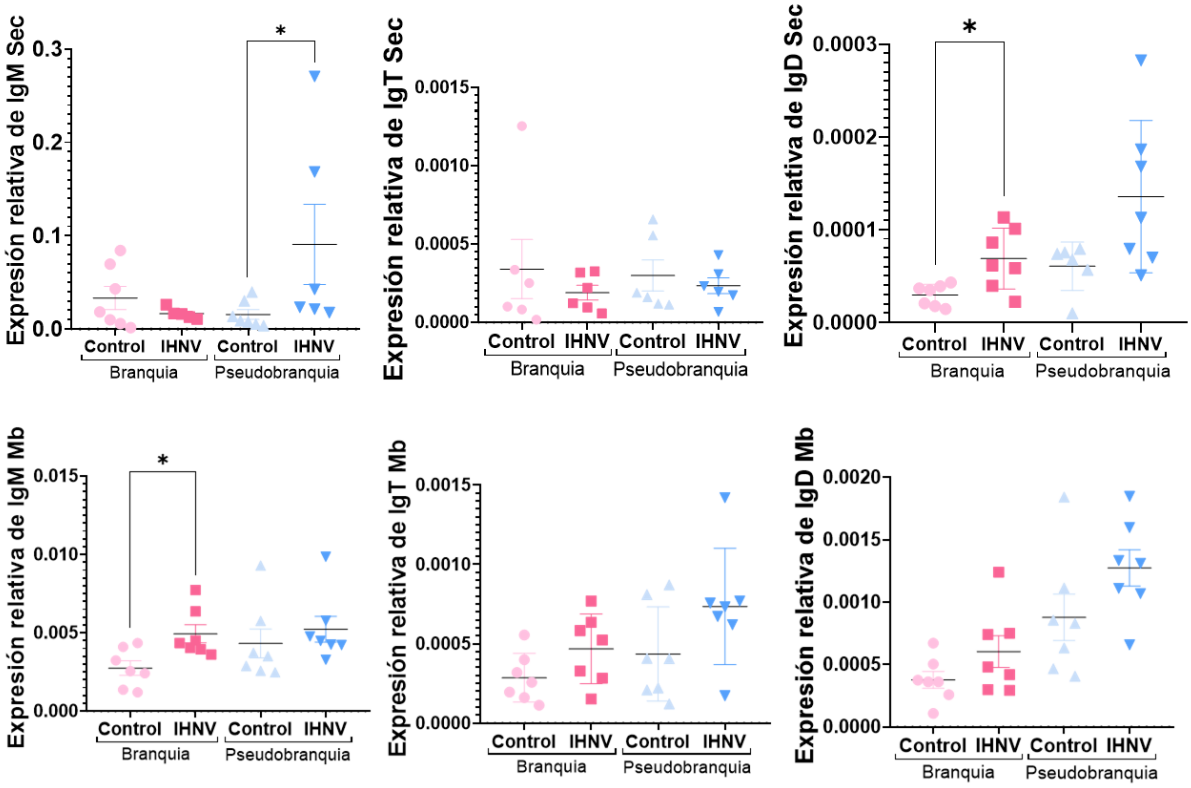


Figura 11. Expresión relativa de inmunoglobulinas en branquia y pseudobranquia a 7 días post-infección (7 dpi). IgM secretada (IgM Sec), IgM de membrana (IgM Mb), IgT secretada (IgT Sec), IgT de membrana (IgT Mb), IgD secretada (IgD Sec), IgD de membrana (IgD Mb). N=7. Se utilizó t de Student (paramétrico) o Mann-Whitney (no paramétrico) para medir las significancias entre grupos independientes. *, **, *** corresponden a valores de significancia (*p* values) de <0.05, <0.01, <0.001 respectivamente.

7. Discusión

En el presente estudio se ha confirmado por primera vez la presencia de poblaciones de linfocitos B y T en la pseudobranquia de trucha arcoíris, evidenciada tanto a nivel de expresión génica (qPCR) como celular (citometría de flujo e inmunofluorescencia). La similitud de estas poblaciones con las descritas en la branquia, junto con la localización estratégica de la pseudobranquia bajo el opérculo, respalda su posible papel en la respuesta inmune mucosal. En este sentido, la modulación observada tras la infección con IHNV refuerza la hipótesis de que este tejido participa activamente en procesos inmunitarios. En conjunto, estos resultados sitúan a la pseudobranquia como un componente potencialmente relevante del sistema inmunitario en peces, cuya respuesta resulta comparable a la de la branquia, un órgano ampliamente caracterizado en este contexto.

Los análisis histológicos realizados en este estudio muestran que branquia y pseudobranquia comparten una arquitectura lamelar, lo que coincide con lo descrito en teleósteos, donde ambas estructuras derivan del arco mandibular y presentan elementos morfológicos homólogos (Thiruppathy et al., 2022). En la branquia, las lamelas observadas corresponden a la organización clásica descrita para peces óseos: estructuras delgadas, altamente vascularizadas y en contacto directo con el medio externo, optimizadas para el intercambio gaseoso y la osmorregulación (Evans et al., 2005). En contraste, la pseudobranquia mostró lamelas más compactas, gruesas, separadas por septos membranosos y sostenidas por un filamento que incluye cartílago, una característica típica de este órgano según estudios morfológicos previos en salmónidos (Godoy, 2025).

Desde un punto de vista inmunológico, la pseudobranquia mostró poblaciones definidas de linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ en % similares a la branquia, lo que concuerda con estudios previos que describen la presencia de células T en tejidos mucosos asociados a la branquia (Nakanishi et al., 2015), pero aportan evidencia novedosa al demostrar, por primera vez, no solo la presencia de estas poblaciones en la pseudobranquia de trucha arcoíris, sino también que su abundancia es comparable a la de los linfocitos T (CD4 y CD8) presentes en la branquia, a pesar de tratarse de un órgano de menor tamaño y sin función directa en el intercambio gaseoso. La inmunofluorescencia confocal permitió corroborar la presencia de ambas subpoblaciones, ofreciendo evidencia visual directa y concluyente de su existencia. En conjunto, estos resultados indican que la pseudobranquia posee un repertorio linfoide completo, similar al de la branquia, lo que respalda su posible papel como órgano con cierta función inmunológica.

Para caracterizar en mayor profundidad las poblaciones linfoides en pseudobranquia, se utilizaron anticuerpos específicos frente a IgM e IgD, marcadores de linfocitos B. Las células B naive (células maduras que aún no han encontrado su antígeno específico) presentan IgM e IgD en su membrana, es decir, son dobles positivas IgM^+-IgD^+ y solo tras el reconocimiento de antígeno comienzan a diferenciarse hacia fenotipos IgM-only o IgD-only (Simón et al., 2022). En un proceso complejo en el que pierden una de estas Igs de su membrana. Este fenotipo es especialmente relevante en tejidos mucosos, que son la primeria línea de defensa frente a patógenos y agentes externos, donde suele observarse una mayor proporción de células B diferenciadas (only) respecto a naive (Herranz-Jusdado et al., 2023).

En trucha arcoíris, la pseudobranquia mostró un porcentaje relativamente mayor de las tres subpoblaciones de células B analizadas (IgM-only, IgD-only y naïve dobles $IgM^{+}IgD^{+}$) en comparación con la branquia, un hallazgo llamativo que sugiere un papel relevante de las células B en este órgano. Comparando las subpoblaciones analizadas en pseudobranquia, abundan los linfocitos B naïve. Una explicación alternativa podría ser la contribución de sangre circulante, dado que la pseudobranquia es un tejido pequeño y altamente vascularizado que mantenía un color rojo vívido incluso tras desangrar a los peces. Esto podría justificar la mayor proporción de células $IgM^{+}IgD^{+}$ observada, procedentes del torrente sanguíneo. No obstante, la presencia significativa de subpoblaciones IgM-only e IgD-only, asociadas a estados más diferenciados, respalda la presencia de linfocitos B residentes en la pseudobranquia, sugiriendo que este tejido podría actuar como un nicho inmunológico funcional capaz de modular respuestas humorales locales.

La infección experimental con IHNV se llevó a cabo con el objetivo de evaluar si la pseudobranquia, al igual que la branquia, es capaz de montar una respuesta inmunitaria frente a un patógeno viral relevante en teleósteos. Dado que la pseudobranquia comparte origen embrionario, arquitectura lamelar y vascularización con la branquia, pero no está en contacto directo con el medio externo, resultaba interesante determinar si este órgano participa en la detección, procesamiento y eliminación del virus, y si su respuesta inmunitaria es comparable, complementaria o diferenciada respecto a la branquia. La cinética de infección a 1, 3 y 7 dpi permitió caracterizar de forma precisa la progresión de la respuesta antiviral en ambos tejidos.

A 1 dpi, la infección vía baño fue claramente efectiva, con detección de IHNV únicamente en los peces infectados tanto en branquia como en pseudobranquia. Este patrón confirma que el virus alcanza rápidamente ambos tejidos, lo cual es coherente con estudios que describen a las branquias como principal vía de entrada y a la circulación sanguínea como ruta de diseminación temprana hacia otros órganos (Dixon et al., 2016; Shao et al., 2022). Sin embargo, la expresión de IFN-γ se mantuvo estable en ambos órganos, sin diferencias entre peces control e infectados. Este resultado indica que la respuesta adaptativa aún no se ha activado, lo cual es esperable en fases tan tempranas, donde predominan los mecanismos innatos mediados por IFN tipo I y genes estimulados por IFN (Ortega-Villaizan et al., 2023; Ortega-Villaizan et al., 2022). En esta fase, la pseudobranquia se comporta de forma similar a

la branquia: detecta la presencia viral, pero todavía no muestra activación transcripcional de linfocitos T.

A 3 dpi se observó un cambio claro en la dinámica inmunitaria. Tanto branquia como pseudobranquia mostraron una inducción significativa de IFN-γ, indicando el inicio de la activación de la respuesta adaptativa. La branquia presentó una inducción más intensa, coherente con su papel como tejido mucoso altamente expuesto y sitio primario de replicación viral. La carga viral seguía siendo elevada en ambos órganos, lo que coincide con la fase de máxima replicación descrita para IHNV entre 2 y 4 dpi (Dixon et al., 2016). En cuanto a los linfocitos T, se observaron diferencias notables entre ambos tejidos. CD4-1 mostró solo una tendencia al aumento en branquia, pero un incremento significativo y robusto en pseudobranquia, lo que sugiere que este órgano podría actuar como un sitio temprano de activación de linfocitos Th, un fenómeno poco descrito en la literatura. CD8-α disminuyó significativamente en branquia, posiblemente por redistribución hacia otros tejidos o por modulación local de la respuesta citotóxica, mientras que en pseudobranquia se mantuvo estable. En conjunto, a 3 dpi la pseudobranquia muestra un perfil inmunitario activo y diferenciado, con activación clara de la vía $CD4^+$, mientras que la branquia presenta una respuesta más heterogénea y centrada en la contención viral.

A 7 dpi se observó la fase más intensa y diferenciada de la respuesta inmunitaria. Ambos tejidos mostraron una fuerte inducción de CD4-1, con un aumento especialmente pronunciado en branquia. En pseudobranquia, además, se detectó un incremento significativo de T-BET, indicando una activación clara de la vía Th1 específicamente en este órgano. Esto demuestra que la pseudobranquia participa activamente en la respuesta adaptativa antiviral, y no como un tejido pasivo. La expresión de CD8-α se mantuvo estable en ambos tejidos, lo que sugiere que la activación citotóxica depende más de moléculas efectoras que de cambios en la expresión de CD8, un patrón descrito en teleósteos (Kordon et al., 2018). Dado que la qPCR se realizó sobre ARN total de tejido, no es posible identificar qué subpoblaciones celulares contribuyen a la expresión de perforina y granzima. Aunque en teleósteos esta actividad se asocia principalmente a linfocitos T $CD8^+$ y células NK-like, la señal podría incluir aportes de otros tipos celulares. En mamíferos, por ejemplo, ciertos linfocitos $CD4^+$ pueden adquirir funciones citotóxicas y expresar perforina y granzima durante infecciones virales (Takeuchi & Saito,

2017). Por tanto, la señal detectada podría reflejar la contribución de varias subpoblaciones celulares.

La respuesta humoral mostró diferencias claras entre órganos. La branquia presentó una activación robusta de IgM Mb, IgM Sec e IgD Sec, lo que indica un aumento de linfocitos B IgM^+ y una mayor producción de anticuerpos IgD en este tejido, coherente con su función como órgano mucoso altamente expuesto (Barac et al., 2025). En pseudobranquia, sin embargo, no se detectaron cambios significativos en IgM Mb pero si en IgM Sec a 7dpi. Lo que sugiere una mayor producción de IgM, probablemente en un intento por neutralizar al virus. La ausencia de cambios en IgM Mb podría indicar que las células plasmáticas productoras de anticuerpos ya estaban diferenciadas antes de 7dpi. IgT, tanto de membrana como secretada, se mantuvo estable en ambos tejidos, lo que coincide con estudios que muestran que IgT se activa preferentemente frente a patógenos extracelulares o parasitarios, pero no necesariamente frente a virus intracelulares (Vicente-Gil et al., 2025). En cuanto a IgD, aunque apenas se observaron diferencias estadísticamente significativas, se aprecia un patrón consistente de inducción tanto de la forma de membrana como de la forma secretada en ambos órganos. Este hallazgo resulta de interés, ya que estudios recientes han puesto de manifiesto un papel potencialmente relevante de IgD en tejidos mucosos como la branquia y la piel de trucha (Barac et al., 2025; Herranz-Jusdado et al., 2023), aunque su función exacta aún no está completamente definida.

En conjunto, la cinética completa de la infección revela que a 1 dpi ambos tejidos detectan el virus sin activar aún la respuesta adaptativa; a 3 dpi se inicia la respuesta Th1, con una activación temprana y marcada de $CD4^+$ en pseudobranquia; y a 7 dpi la respuesta adaptativa está plenamente establecida, con una fuerte activación Th1 y citotóxica en pseudobranquia y una respuesta humoral robusta en branquia. Estos resultados demuestran que la pseudobranquia no solo detecta el virus, sino que participa activamente en la respuesta inmunitaria, mostrando un perfil funcional propio y complementario al de la branquia. Esto respalda la hipótesis central del estudio: la pseudobranquia actúa como un órgano inmunitario funcional en teleósteos. En este contexto, la pseudobranquia aparece como una estructura poco explorada con posible relevancia inmunitaria y potencial para mejorar la profilaxis en acuicultura.

8. Conclusiones

- La pseudobranquia alberga un repertorio linfoide completo, incluyendo linfocitos B IgM^+, IgD^+ e IgM^+IgD^+, así como linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$, en proporciones comparables a las de la branquia.
- La presencia de células T $CD4^+$ y $CD8^+$ fue confirmada mediante inmunofluorescencia, aportando evidencia visual directa de actividad inmunitaria local en pseudobranquia.
- La pseudobranquia mostró una activación antiviral clara tras la infección por IHNV, con inducción significativa de IFN-γ y expresión detectable de IHNV, indicando replicación viral y activación de la vía Th1.
- Los genes citotóxicos perforina y granzima se indujeron fuertemente en ambos tejidos, con una respuesta especialmente intensa en pseudobranquia, lo que sugiere una participación activa de linfocitos T citotóxicos en este órgano.
- La modulación de Igs mostró respuestas específicas según isotipo y tejido, con activación humoral en branquia, pero patrones más estables en pseudobranquia.
- En conjunto, los resultados demuestran que la pseudobranquia actúa como un órgano inmunitario funcional, capaz de detectar infección, activar vías antivirales y movilizar respuestas citotóxicas y humorales.

9. Referencias Bibliográficas

Abós, B., Bailey, C., & Tafalla, C. (2022). Adaptive Immunity. En K. Buchmann & C. J. Secombes (Eds.), *Principles of Fish Immunology* (pp. 105-140). Springer International Publishing.

APROMAR. (2024). *Informe Anual de la Acuicultura en España 2024* (v1.4). Asociación Empresarial de Acuicultura de España.

Barac, F., Castro, P. L., Hansen, T. J., Fjelldal, P. G., Kerboeuf, M., Boysen, P., Hordvik, I., Bjørgen, H., & Koppang, E. O. (2025). B-cell distribution and composition in the gills and the interbranchial lymphoid tissue (ILT) of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *The Journal of Immunology*,

Bjørgen, H., & Koppang, E. O. (2022). Anatomy of Teleost Fish Immune Structures and Organs. En K. Buchmann & C. J. Secombes (Eds.), *Principles of Fish Immunology* (pp. 1-30). Springer International Publishing.

Boletín Oficial del Estado. (2019). *Real Decreto 638/2019, de 8 de noviembre, por el que se establecen disposiciones en materia de sanidad animal*. Gobierno de España.

Buchmann, K., & Secombes, C. J. (Eds.). (2022). *Principles of fish immunology: From cells and molecules to host protection*. Springer.

Dalum, A. S., Austbø, L., Bjørgen, H., Skjødt, K., Hordvik, I., Hansen, T., Fjelldal, P. G., Press, C. M., Griffiths, D. J., & Koppang, E. O. (2015). The interbranchial lymphoid tissue of A tlantic S almon (*S almo salar* L) extends as a diffuse mucosal lymphoid tissue throughout the trailing edge of the gill filament. *Journal of Morphology*, *276*(9), 1075-1088.

Dixon, P., Paley, R., Alegria-Moran, R., & Oidtmann, B. (2016). Epidemiological characteristics of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV): A review. *Veterinary Research*, *47*(1), 63.

Evans, D. H., Piermarini, P. M., & Choe, K. P. (2005). The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. *Physiological Reviews*, *85*(1), 97-177.

FAO (Ed.). (2024). *Blue transformation in action*. FAO.

FAO. (2024). FAO *Fisheries and Aquaculture Statistics: Global aquaculture production (quantity)*. FAO.

Godoy, M. (2025). *Histología de pseudobranquias.*

Herranz-Jusdado, J. G., Morel, E., Simón, R., Díaz-Rosales, P., & Tafalla, C. (2023). Teleost $IgD^{+}IgM^{-}$ B cells in gills and skin have a plasmablast profile, but functionally and phenotypically differ from $IgM^{+}IgD^{-}$ B cells in these sites. *iScience*, *26*(8), 107434.

Koppang, E. O., Fischer, U., Moore, L., Tranulis, M. A., Dijkstra, J. M., Köllner, B., Aune, L., Jirillo, E., & Hordvik, I. (2010). Salmonid T cells assemble in the thymus, spleen and in novel interbranchial lymphoid tissue. *Journal of Anatomy*, *217*(6), 728-739.

Kordon, A. O., Karsi, A., & Pinchuk, L. (2018). Innate Immune Responses in Fish: Antigen Presenting Cells and Professional Phagocytes. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *18*(9).

Li, J., Barreda, D. R., Zhang, Y.-A., Boshra, H., Gelman, A. E., LaPatra, S., Tort, L., & Sunyer, J. O. (2006). B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2024). *Peste equina africana: Legislación y normativa aplicable*. Gobierno de España.

Mkulo, E. M., Iddrisu, L., Yohana, M. A., Zheng, A., Zhong, J., Jin, M., Danso, F., Wang, L., Zhang, H., Tang, B., Zhou, H., Amoah, K., Huang, J., Wang, B., & Wang, Z. (2025). Exploring salinity adaptation in teleost fish, focusing on omics perspectives on osmoregulation and gut microbiota. *Frontiers in Marine Science*, *12*, 1559871.

Mohd Faudzi, N., Sariat, S. A., Zuldin, W. H., Ransangan, J., Senoo, S., & Fui, C. F. (2024). Introduction to Aquaculture. En N. M. Faudzi, M. D. Shah, N. Mazlan, & S. Raehanah Muhamad Shaleh (Eds.), *Essentials of Aquaculture Practices* (pp. 1-20). Springer Nature Singapore.

Mokhtar, D. M. (2021). *Fish histology: From cells to organs* (Second edition). Apple Academic Press.

Nakanishi, T., Shibasaki, Y., & Matsuura, Y. (2015). T Cells in Fish. *Biology*, *4*(4), 640-663.

Olabuenaga, S. E. (2000). SISTEMA INMUNE EN PECES. *Gayana (Concepción)*, *64*(2).

Ortega-Villaizan, M. D. M., Chico, V., & Perez, L. (2022). Fish Innate Immune Response to Viral Infection—An Overview of Five Major Antiviral Genes. *Viruses*, *14*(7), 1546.

Ortega-Villaizan, M., Mercado, L., & Chico, V. (2023). Editorial: Antiviral immune response in fish and shellfish. *Frontiers in Immunology*, *14*, 1155538.

Páez, D. J., LaDeau, S. L., Breyta, R., Kurath, G., Naish, K. A., & Ferguson, P. F. B. (2020). Infectious hematopoietic necrosis virus specialization in a multihost salmonid system. *Evolutionary Applications*, *13*(8), 1841-1853.

Salinas, I. (2015). The Mucosal Immune System of Teleost Fish. *Biology*, *4*(3), 525-539.

Shao, Y., Zhao, J., Ren, G., Lu, T., Chen, X., & Xu, L. (2022). Early or Simultaneous Infection with Infectious Pancreatic Necrosis Virus Inhibits Infectious Hematopoietic Necrosis Virus Replication and Induces a Stronger Antiviral Response during Co-infection in Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss). *Viruses*, *14*(8), 1732.

Simón, R., Arrogante, A., Nogales-Mérida, S., Díaz-Rosales, P., & Tafalla, C. (2026). DNA vaccination against viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) affects the capacity of kidney leukocytes to respond to a posterior viral encounter. *Vaccine*, *79*, 128512.

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*, 584.

Simón, R., Martín-Martín, A., Morel, E., Díaz-Rosales, P., & Tafalla, C. (2022). Functional and Phenotypic Characterization of B Cells in the Teleost Adipose Tissue. *Frontiers in Immunology*, *13*, 868551.

Takeuchi, A., & Saito, T. (2017). CD4 CTL, a Cytotoxic Subset of CD4+ T Cells, Their Differentiation and Function. *Frontiers in Immunology*, *8*.

Thiruppathy, M., Fabian, P., Gillis, J. A., & Crump, J. G. (2022). Gill developmental program in the teleost mandibular arch. *eLife*, *11*, e78170.

Tripathi, S., Singh, K. P., & Gopesh, A. (2025). Structural organization of pseudobranch of the hill-stream fish, Schizothorax richardsonii: A pilot study. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, *86*(1), 88.

Unión Europea. (2010). *Reglamento (UE) n.º 276/2010 del Parlamento Europeo y del Consejo*. Diario Oficial de la Unión Europea.

Vaz, M., Themudo, G. E., Schöninger, F. B., Carvalho, I., Tafalla, C., Díaz-Rosales, P., Ramos-Pinto, L., Costas, B., & Machado, M. (2025). Unraveling the Systemic and Local Immune Response of Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss) to the Viral Hemorrhagic Septicemic Virus. *Biology*, *14*(8), 1003.

Vicente-Gil, S., Pianese, V., Morel, E., Abós, B., Jiménez-Barrios, P., Perdiguero, P., Martín, D., Simón, R., Picchietti, S., Scapigliati, G., & Tafalla, C. (2025). IgT and IgD dominance in the teleost central nervous system. *Frontiers in Immunology*, *16*, 1657738.

Wilson, J. M., & Laurent, P. (2002). Fish gill morphology: Inside out. *Journal of Experimental Zoology*, *293*(3), 192-213.

10. Anexos

Gen	Forward primer sequences	Reverse primer sequences
IFN-Y	GAAGGCTCTGTCCGAGTTCA	TGTGTGATTTGAGCCTCTGG
Carga viral (IHNV)	AGAGCCAAGGCACTGTGCG	TTCTTTGCGGCTTGGTTGGA
CD8-a	ACGACTACACCAATGACCACAACC	CAGTGATGATGAGGAGGAGGAAGA
CD4-1	GAGTACACCTGCGCTGTGGAAT	GGTTGACCTCCTGACCTACAAAGG
IgD Mb	CAGGAGGAAAGTTCGGCATCA	CCTCAAGGAGCTCTGGTTTGGA
IgD Sec	TGGCACGCCAGGATTTGAC	TCAGAATTGAGTGAACGGACAGACA
T-BET	GTTCTGCAGTCGCTTCATAAGTACC	CTATGAATTGGGTCTCTGGGAAGAC
GATA3	CCCATCGGTGCTAAACGAACA	GCTGTGGTGCTGCATTGCTT
FOXP3	CCAGAACCGAGGTGGAGTGT	TGACGGACAGCGTTCTTCCA
Granzima	CTAGGGGTCCACTCCATCAA	GTCTCACCGCCTTAGTCAGC
Perforina	GGAACGACGACCTGTTAGGA	TCATAGGGGAGGGCACATAG
IgM Sec	TACAAGAGGGAGACCGGAGGAGT	CTTCCTGATTGAATCTGGCTAGTGGT
IgM Mb	CCTACAAGAGGGAGACCGATTGTC	GTCTTCATTTCACCTTGATGGCAGT
IgT Sec	CATCAGCTTCACCAAAGGAAGTGA	TCACTTGTCTTCACATGAGTTACCCGT
IgT Mb	TCGAAGTCCACGGCGAACA	GTGTTCTTCACCGCTTCATCTTGAA
IL-17	CTGGCGGTACAGCATCGATA	GAGTTATATCCATAATCTTCGTATTCGGC

Tabla Suplementaria 1. Secuencias de los primers utilizados para la amplificación de genes inmunitarios mediante qPCR en el experimento de infección con IHNV. Se incluyen los cebadores específicos para genes relacionados con respuesta antiviral, citotóxica y humoral en *Oncorhynchus mykiss*.