

1.1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

La enfermedad descompresiva (EDC) es un síndrome producido cuando la presión parcial de los gases disueltos en el organismo supera la presión ambiental, provocando la formación de burbujas de gas en circulación y tejidos (Vann et al., 2011). Éstas pueden provocar alteraciones mecánicas, embólicas y bioquímicas/inflamatorias (es decir, estrés o daño celular). En humanos, los principales signos clínicos graves son trastornos neurológicos, pulmonares, sistémicos y de oído interno (Lemaitre, 2009). Sujetos sometidos al mismo perfil de inmersión pueden mostrar un patrón muy diferente de formación de burbujas de gas (Nishi, 1993), siendo la variabilidad un factor a tener en cuenta en este síndrome.

La EDC se ha estudiado tradicionalmente en humanos (Francis, 2002; Vann et al., 2011), pero se ha descrito recientemente en especies marinas, como las tortugas marinas (García-Párraga et al., 2014) y los cetáceos (Jepson et al., 2003; Fernández et al., 2005). Éstos se presuponían estar protegidos frente a EDC gracias a sus adaptaciones al buceo (Piantadosi y Thalmann, 2004). Sin embargo, una patología compatible con EDC fue descrita por primera vez en un varamiento masivo de zifios coincidente en tiempo y espacio con el uso de sonar en maniobras navales (Jepson et al., 2003; Fernandez et al., 2005). Desde entonces, se ha diagnosticado enfermedad compatible con EDC en cetáceos en varios zifios varados asociados a ejercicios navales, pero también en calderones grises en interacción con sus presas (Arbelo et al., 2008; Bernaldo de Quirós et al., 2011; Fernández et al., 2012; Bernaldo de Quirós et al., 2019). Independientemente de la literatura reciente, la controversia en la comunidad científica sobre si las adaptaciones al buceo previenen la aparición de enfermedad compatible con EDC en cetáceos sigue en debate. Por ello, es necesario investigar y aportar más evidencias de esta patología en este grupo de animales marinos. A diferencia de los humanos y las tortugas marinas, en los que el diagnóstico y estudio de la EDC es clínico, este síndrome en cetáceos sólo puede ser estudiado en animales varados mediante estudios patológicos postmortem. En medicina humana, los modelos experimentales de EDC se han utilizado tradicionalmente en pequeños mamíferos como conejos, ratas y ratones, centrándose en la prevención y potenciales tratamientos. A pesar de la extensa literatura sobre modelos experimentales de EDC, pocos han profundizado en los aspectos patológicos, siendo necesario un estudio patológico completo y actualizado para reforzar el diagnóstico patológico de enfermedad compatible con EDC.

El uso tradicional de pequeños mamíferos en EDC experimental podría ser reemplazado por un modelo alternativo de peces. Esto se postuló debido a las similitudes en la formación de burbujas de gas intravasculares y extravasculares de la enfermedad de

las burbujas de gas (EBG) en peces y la EDC en mamíferos (D'Aoust y Smith, 1974; Machado et al., 1987). La EBG es una patología ampliamente descrita en peces que habitan grandes presas, donde masas de agua caen de un embalse a otro, provocando el atrapamiento y disolución de gases atmosféricos debido a la presión hidrostática (Bouck et al., 1976; Weitkamp y Katz, 1980). Por tanto, esta agua pasa a estar sobresaturada de gases disueltos y es responsable de una gran mortandad de peces en las presas. El desarrollo de un embolismo gaseoso y lesiones asociadas descritos en la EBG son muy similares a las observadas en la descompresión experimental y natural (Speare, 1998).

Teniendo en cuenta las similitudes patológicas entre EBG y EDC y aplicando el principio de reemplazo descrito en la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo que establece la necesidad de utilizar animales con menor capacidad de sentir dolor, sufrimiento o daño prolongado, podría utilizarse un modelo de embolismo gaseoso en peces como base para explorar la fisiopatología de la EDC. Este modelo podría ser útil para el estudio de las lesiones patológicas asociadas a las burbujas de gas y para el estudio de las alteraciones bioquímicas/inflamatorias causadas por éstas en vasos sanguíneos y tejidos.

La presente investigación se ha desarrollado para ampliar el conocimiento sobre la patología y las alteraciones celulares asociadas a las lesiones por burbujas de gas. Los objetivos principales fueron:

1. Caracterizar la patología asociada a la EDC en un modelo animal bien establecido, el conejo blanco neozelandés, y comparar estos resultados con los descritos en cetáceos que presentan una patología compatible con EDC.
2. Inducir de manera rigurosa y reproducible la enfermedad de las burbujas de gas severa en peces.
3. Evaluar y validar el modelo de pez de enfermedad de las burbujas de gas severa para estudiar las lesiones por burbujas de gas y sus efectos a nivel celular en EDC.

1.2. RESUMEN DE LAS PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

1.2.1. PUBLICACIÓN I: Patología descompresiva en cetáceos basada en un modelo patológico experimental.

Teniendo en cuenta los antecedentes explicados en el apartado anterior, el objetivo de esta publicación es validar los resultados patológicos observados en cetáceos mediante un modelo experimental en conejos sometidos a EDC severa.

Para este estudio se diseñaron dos grupos experimentales con un total de 18 conejos, divididos en 14 conejos sometidos a un protocolo de compresión/descompresión (grupo C/D) y 4 conejos controles (grupo control). Los animales se mantuvieron anestesiados durante ambos protocolos. El grupo C/D se comprimió en cámara hiperbárica a 8ATA durante 45 min seguido de una descompresión rápida. Se obtuvieron dos subgrupos: conejos que murieron tras descompresión (grupo C/D muertos) y aquellos supervivientes, eutanasiados tras 1h (grupo C/D eutanasiados). Los animales control fueron eutanasiados tras permanecer en la cámara hiperbárica sin presión. Las necropsias se realizaron primero evaluando el gas score, un método de puntuación del 0-6 para gas distintas localizaciones intravasculares y 0-3 para gas extravascular (Bernaldo de Quirós et al., 2016). Para los estudios estadísticos pertinentes, se utilizó la moda para cada localización elegida. Paralelamente se realizó el examen macroscópico y microscópico. Los resultados patológicos experimentales en conejos fueron comparados con 31 cetáceos diagnosticados previamente con patología descompresiva (Fernández et al., 2005; Arbelo et al., 2008; Bernaldo de Quirós et al., 2011; Fernández et al., 2012; Fernández et al., 2017; Bernaldo de Quirós et al., 2019).

Los animales control y C/D eutanasiados presentaron una moda de gas score 0 y el grupo C/D muertos modas de gas score de 5 y 6 en todas las localizaciones, con abundante número de burbujas o secciones de vasos completamente llenas de gas. El grupo C/D muertos presentó burbujas de gas macroscópicas y microscópicas distribuidas principalmente en vasos sanguíneos de pulmón, riñón y corazón. Microscópicamente estas burbujas de gas se observaban como espacios circulares a ovalados no teñidos entre las células sanguíneas (**Fig. 1**). Estos hallazgos también han sido descritos en modelos animales de EDC (Eggleton et al., 1945; Lever et al., 1966; Shim et al., 1967; L'Abbate et al., 2010; Geng et al., 2015) y en cetáceos (**Fig. 1**) (Fernández et al., 2005; Arbelo et al., 2008; Fernández et al., 2017).

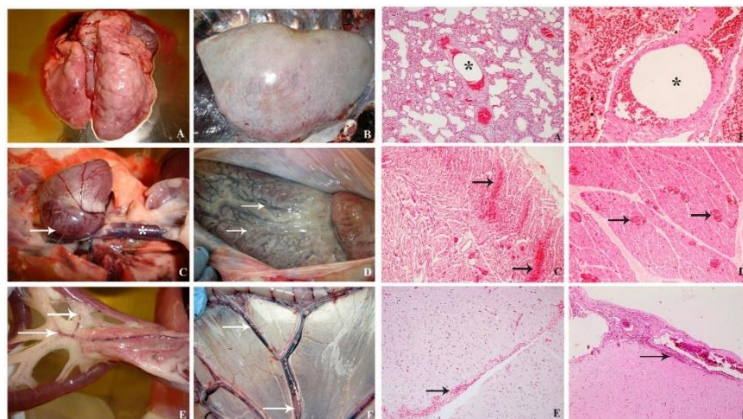


Figura 1. Comparativa de hallazgos patológicos entre conejos con EDC experimental (A, C, E) y cetáceos con diagnóstico compatible con EDC (B, D, F). Se observa principalmente burbujas de gas macroscópicas (flechas y asterisco blancos) y microscópicas (asteriscos negros) en estructuras vasculares de diferentes órganos como pulmón,

corazón o mesenterio; así como enfisema pulmonar macroscópico y microscópico junto con hemorragias microscópicas en espacio subaracnoideo y corazón (flechas negras).

El grupo control solo presentó congestión generalizada. El órgano más afectado en el modelo C/D fue el pulmón, describiéndose hallazgos similares en modelos de EDC (Geng et al., 2015; Ni et al., 2011; Tang et al., 2020; Zhang et al., 2016) y en cetáceos (Fernández et al., 2005; Fernández et al., 2017). Además de enfisema pulmonar, se observó enfisema en bazo con mayor severidad en C/D muertos que en C/D eutanasiados, lesión descrita también por Clay (1963) en perros. Se observó enfisema multifocal leve de tejido adiposo en la mayoría de los conejos del grupo C/D muertos, concordando con cetáceos (Fernández et al., 2005; Fernández et al., 2017). Teniendo en cuenta que el nitrógeno es más soluble en tejidos grasos (Shim et al., 1967), este hallazgo debe tenerse en cuenta en el diagnóstico de la EDC.

Las burbujas de gas pueden provocar vasoconstricción, generando isquemia, edema y hemorragias en órganos diana como el pulmón (Saukko and Knight, 2004). En este estudio, se observaron hemorragias pulmonares severas en el grupo C/D muertos, en concordancia con modelos animales (Geng et al., 2015; Ni et al., 2011; Bao et al., 2015) y cetáceos (Fernández et al., 2005; Fernández et al., 2017). En zifios diagnosticados con enfermedad compatible con EDC se describió la presencia de hemorragias agudas diseminadas en el sistema nervioso central (Fernández et al., 2005), hallazgos también presentes en este estudio. Se observó edema pulmonar intersticial y alveolar en ambos grupos C/D, similar a otros modelos (Geng et al., 2015; Tang et al., 2020) y cetáceos (Fernández et al., 2012), siendo en estos estudios una de las lesiones más frecuentes junto con enfisema, a diferencia del presente estudio.

Los cambios musculares agudos se asocian a situaciones de estrés (Câmara et al., 2019). En este estudio, los cambios musculares observados fueron poco relevantes probablemente debido a la anestesia, a diferencia de lo que se observaría en cetáceos debido al estrés descompresivo. Es común que se observen microtrombos de fibrina en modelos de EDC (Tanoue et al., 1987; Geng et al., 2015), aunque en este estudio no se observaron y en cetáceos tampoco se ha relacionado su presencia. En este estudio se observó que individuos sometidos al mismo protocolo y perfiles similares pueden tener una formación de burbujas de gas variable, hecho previamente descrito (Shim et al., 1967; L'Abbate et al., 2010).

En conclusión, los conejos muertos tras descompresión presentaban mayor abundancia de burbujas de gas sistémicas, enfisema y hemorragias en órganos vitales. Las mismas lesiones han sido observadas en cetáceos con enfermedad compatible con EDC, reforzando los hallazgos patológicos. La mitad de los conejos que sobrevivieron no mostraron las mismas lesiones o severidad, revelando que la variabilidad individual juega

un papel esencial en esta enfermedad, tal y como se ha hipotetizado en otros modelos animales y medicina humana del buceo.

1.2.2. PUBLICACIÓN II: Establecimiento de un modelo en peces para estudiar las lesiones por burbujas de gas.

Resumiendo lo descrito anteriormente, los peces pueden sufrir de EBG, una enfermedad caracterizada por la formación de burbujas de gas sistémicas similares a las de EDC. Los signos clínicos más frecuentes asociados a EBG son pérdida de flotabilidad, natación errática, así como burbujas de gas en ojos y aletas (Cao et al., 2020). Los estudios de EBG se han centrado principalmente en la supervivencia de especies en estas aguas (Stevens et al., 1980; Geist et al., 2013; Wang et al., 2015), siendo postulado por algunos autores un modelo in vivo de EBG para estudiar el embolismo gaseoso de la EDC, desde la perspectiva de la fisiopatología endotelial desencadenada por la presencia de estas burbujas de gas, común a ambas enfermedades (D'Aoust and Smith, 1974; Speare, 1998; Roberts, 2012). Dadas las similitudes presentadas y teniendo en cuenta el principio de reemplazo (Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo), el objetivo de este estudio es obtener un modelo reproducible de EBG severa en peces para estudiar las lesiones asociadas a las burbujas de gas, similares a EDC.

Para ello, se diseñó en primer lugar un sistema para generar agua sobresaturada siguiendo el esquema de Bouck et al. (1976). Se adquirió un circuito conformado por una vasija de presión (5), que se rellenaba con agua corriente (15) y a la que se le inyectaba aire sintético de botella (4, 10). El agua sobresaturada se conseguía mediante recirculación constante (2) junto con el paso del gas inyectado por materiales porosos de diámetro fino (3) dispuestos dentro del circuito, que forzaban su disolución en el agua. Esto provocaba un aumento del total de gases disueltos (TGD), que se medía de forma constante mediante un sensor de TGD (6*). La mayoría de los estudios experimentales previos describían valores estables de TGD mientras se recirculaba el agua con un tanque abierto (Huang et al., 2010). Sin embargo, no pudimos recircular el agua en estas condiciones por las diferencias de presión entre el acuario abierto y el circuito, por lo que el agua se mantuvo estanca, observando pérdida de TGD casi inmediata. Debido a esto, se decidió modificar el circuito acoplando un acuario presurizable (7) (**Fig. 2**). Este nuevo sistema permitía la recirculación de agua sobresaturada por todo el circuito (incluido acuario presurizable) y el mantenimiento constante del TGD. Con este diseño, se realizaron pruebas piloto sin peces para ajustar parámetros, variando la cantidad de aire sintético inyectado y el tiempo de recirculación, con el objetivo de mantener un TGD superior a 1140 mmHg (saturación de 150%) durante todo el experimento.

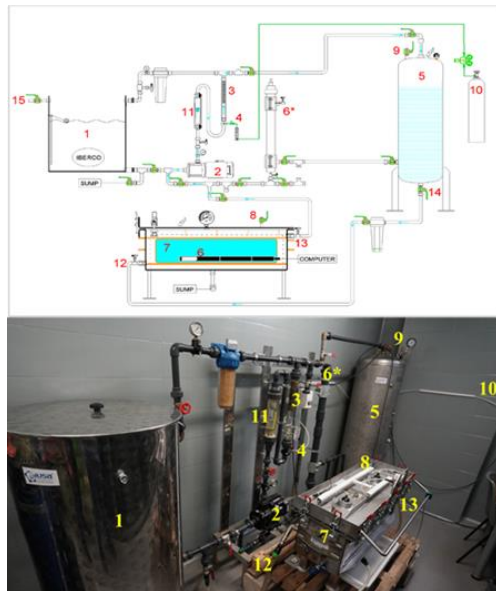


Figura 2. Circuito con vasija de presión y acuario presurizable. (1) Recipiente abierto. (2) Motobomba. (3) Tubo de disolución. (4) Válvula de inyección de aire sintético. (5) Vasija de presión. (6) TDG y sensor de temperatura. (6*) TDG y sensor de temperatura dentro del circuito abierto. (7) Acuario presurizado. (10) Botella de aire sintético. (15) Entrada de agua corriente.

Las pruebas piloto se realizaron con 10 carpas adultas, previa aclimatación. Los experimentos se realizaron por parejas, comenzando con 3h de exposición. Los valores de saturación de TGD se establecieron aproximadamente en 170%. Si no se observaban burbujas de gas masivas, se duplicaba el tiempo de exposición. Se estableció un punto final humanitario cuando los peces mostraran pérdida de flotabilidad, natación errática y letargia. Se colocaron dos controles en el acuario presurizable sin recirculación de agua durante 18h. Durante toda la duración del experimento, se monitorizó a los peces observando su comportamiento, frecuencia de nado, latidos operculares y presencia de lesiones externas. Al finalizar, los peces se eutanasiaron y se realizó el examen macroscópico y microscópico.

El primer diseño con acuario abierto mostró una disminución de la saturación de TGD de 150 a 125% en 6h. Al introducir un acuario presurizado con circuito cerrado en recirculación constante, se produjo saturación de TGD mantenido de entre 160-180%. La fluctuación de TGD durante el experimento se dividió en 4 etapas. La primera, de carácter ascendente, debido a la producción de agua sobresaturada; la segunda de valor máximo de TGD y su estabilización; la tercera del leve descenso por la introducción de peces y rápida recuperación a niveles anteriores; y, por último, la cuarta de mantenimiento del TGD. Los grupos de 3h, 6h y 12h presentaron EBG, pero no masivo. El grupo de 18h se planificó inicialmente en 24h, pero ambos peces alcanzaron el punto final humanitario a las 18h, mostrando pérdida de flotabilidad y letargo. Los valores medios de saturación de TGD para el grupo de 18h fueron de 162-163% (**Fig. 3**).

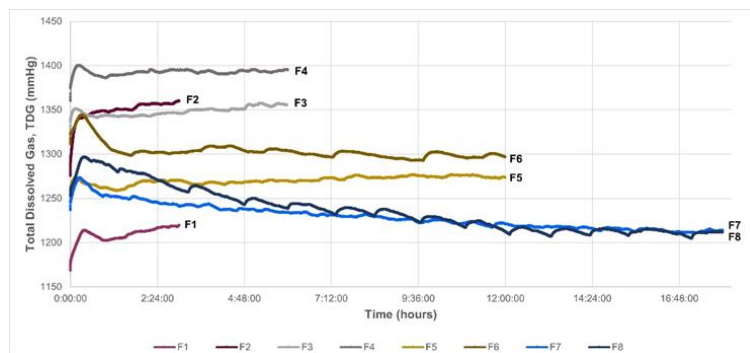


Figura 3. Valores de TGD desde la introducción de peces hasta el fin del tiempo experimental. F1-F2 corresponden al grupo de 3 h, F3-F4 al de 6 h, F5-F6 al de 12 h y F7-F8 al de 18 h.

Ambos peces del grupo de 18h presentaron signos clínicos similares al ser introducidos en el acuario presurizado. Agitación intensa, tres veces más frecuencia opercular que los peces control e intensa frecuencia de nado, dos veces más rápido que los controles. Entre 5-10 min tras la introducción, se paralizaron en el fondo del acuario. Después recuperaron lentamente la velocidad de nado y la frecuencia opercular habitual. Se visualizaron pequeñas burbujas de gas en las aletas laterales y anal después de 30 min de exposición, alcanzando éstas un mayor tamaño entre 1-2h de exposición. Entre las 6-12h del experimento, se registraron numerosas burbujas de gas en todas las aletas. En el último intervalo (12-18h), los peces presentaron pérdida de escamas. De 17-18h de exposición, los peces volvieron al fondo del acuario presurizado, con movimientos erráticos, pérdida de flotabilidad y rigidez de las aletas con hemorragias severas, congestión y burbujas de gas, siendo muy evidente estos signos clínicos a las 18h. Los peces fueron eutanasiados en este punto, siguiendo el punto final humanitario preestablecido.

En el examen externo, todas las aletas presentaban enfisema severo, hemorragias multifocales y burbujas de gas dentro de los vasos sanguíneos. Los peces presentaban pérdida de escamas con enfisema subcutáneo y las branquias congestión severa. Internamente, se observó la presencia de abundantes burbujas de gas en el corazón, aorta ventral, venas cardinales posteriores, venas gonadales, vena de la vejiga natatoria y venas intercostales. Además, se observó congestión generalizada severa de órganos, principalmente de hígado, riñón y bazo, y moderada de grasa visceral. Microscópicamente, se observaron grandes dilataciones no teñidas compatibles con enfisema en las aletas junto con hemorragias multifocales moderadas y algunos espacios vacíos ovalados intravasculares en forma de burbujas entre las células sanguíneas. Las branquias presentaban áreas congestivas severas con grandes burbujas de gas en capilares sanguíneos. En el bazo y el riñón posterior se observaron burbujas de gas, mostrando este último algunas zonas hemorrágicas entre los túbulos renales. La rete mirabile de la vejiga natatoria, el hígado, las estructuras oculares y el sistema nervioso central mostraban un aspecto congestivo moderado. Las mismas estructuras circulares se observaron dentro de

estructuras vasculares de hígado, tracto digestivo, ojos, sistema nervioso central, branquias y ventrículo del corazón.

La patología de EBG descrita en la literatura consiste en burbujas de gas y hemorragias en las aletas (Cao et al., 2015), congestión y hemorragias branquiales, exoftalmia (Xue et al., 2019), lesiones microscópicas como burbujas de gas en vasos sanguíneos, hemorragias y congestión en diferentes tejidos (Pauley and Nakatani, 1967), coincidiendo los hallazgos con los observados en este estudio. En general, estos hallazgos patológicos también coinciden con los de la EDC, tanto los descritos en pequeños mamíferos con EDC explosiva experimental (Geng et al., 2015; Zhang et al., 2016; Velázquez-Wallraf et al., 2021), como los de EDC natural (Fernández et al., 2005; García-Párraga et al., 2014; Edmonds, 2015), validando la traslación de este modelo desde el punto de vista patológico.

En conclusión, se reprodujo una EBG masiva con severa presencia de burbujas de gas intravasculares y extravasculares similares a las de EDC. El diagnóstico clínico se confirmó mediante un estudio patológico. Éste representa el primer establecimiento de un modelo de pez como alternativa a mamíferos para el estudio de las burbujas de gas producidas en EDC en humanos y otras especies afectadas, y podría ser un modelo útil para profundizar en la fisiopatología de las burbujas de gas en los tejidos. La principal limitación de este modelo es que no podría aplicarse a estudios del origen y formación de las burbujas en la EDC ya que, aunque el embolismo gaseoso causado sea similar en ambas enfermedades, sus causas son diferentes.

1.2.3. PUBLICACIÓN III: Biomarcadores relacionados con embolismo gaseoso: gas score, patología y expresión génica en un modelo de enfermedad de las burbujas de gas.

El embolismo gaseoso genera respuestas fisiopatológicas, particularmente en las células endoteliales (Zhang et al., 2016), la primera línea celular en entrar en contacto con las burbujas de gas intravasculares, siendo la disfunción o daño endotelial correlacionado positivamente con la presencia de éstas (Obad et al., 2007). Además, estas burbujas provocan una interfaz sangre-burbuja circulante (Kitano et al., 1978), que activa moléculas como la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), expresada por las células endoteliales para favorecer la migración de leucocitos a través del endotelio hacia el tejido inflamado (Yang et al., 2005). Las células endoteliales también generan biomarcadores de estrés endotelial, como la familia de proteínas de estrés térmico (HSP) (Zhang et al., 2016). Las células endoteliales son una fuente de sustancias vasoactivas, como el óxido nítrico (ON), una molécula vasodilatadora que en condiciones de daño endotelial ve disminuida su producción provocando un aumento relativo de su

antagonista, la endotelina 1 (ET-1). Los biomarcadores expresados representan un objetivo importante para seguir investigando el embolismo gaseoso (Fismen et al., 2012). En este estudio, probamos la hipótesis de que la EBG en peces induce respuestas vasculares y celulares similares a otras embolias gaseosas, como la EDC en mamíferos, y reforzamos su utilización como modelo experimental alternativo.

Para este estudio se utilizaron 20 carpas que, previamente aclimatadas, se dividieron en dos grupos: un grupo control de 10 animales y un grupo EBG con otros 10 animales. Los peces del grupo EBG fueron introducidos individualmente durante 18 horas en un acuario presurizado con agua sobresaturada producida siguiendo nuestra publicación anterior (Velázquez-Wallraf et al., 2022), con valores de saturación de TGD de $169\pm 5\%$. Los peces del grupo control se introdujeron 18 horas en el acuario presurizable, sin presión ejercida y con agua sin sobresaturar. Durante la exposición, se monitorizó el comportamiento y los signos clínicos, de acuerdo con lo descrito en nuestra publicación anterior (Velázquez-Wallraf et al., 2022).

Después de 18 horas, todos los peces fueron eutanasiados. La necropsia se realizó comenzando con el examen externo y la aplicación del método del gas score de Bernaldo de Quirós et al. (2016) adaptado a peces. Las localizaciones intravasculares elegidas fueron venas de aleta, opérculo, subcutáneas craneales y caudales, de vejiga natatoria y cardinales posteriores, así como aorta ventral y dorsal, calificadas de 0 a 6. Las localizaciones extravasculares fueron puntuadas de 0 a 3, siendo valorado el enfisema en grasa visceral y en aletas. El gas score total de cada pez se calculó con la sumatoria de todas las localizaciones. Al mismo tiempo, se realizó el estudio macroscópico y microscópico, recolectando muestras de todos los órganos. Además de realizar la tinción rutinaria con hematoxilina-eosina, las muestras se pretrataron con ácido crómico para preservar la grasa y poder confirmar que los espacios no teñidos eran burbujas de gas y no grasa.

Del total de 10 peces dentro de cada grupo, 6 fueron utilizados para el estudio de biomarcadores, almacenando en RNA-later muestras de riñón posterior, branquias, corazón y aorta ventral. Los genes seleccionados fueron HSP70, HSP90, E-1 e ICAM-1, estudiados mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) y por triplicado. Se llevaron a cabo análisis estadísticos de los resultados para evaluar la diferencia de expresión génica entre grupo control y grupo EBG. Además, se realizó una correlación entre el gas score total y la expresión de genes con diferencias significativas o con tendencia positiva del grupo EBG. También se calculó el poder estadístico de cada resultado.

Durante el tratamiento, todos los peces del grupo EBG mostraron signos clínicos consistentes con EBG severa, como el aumento de la frecuencia opercular y natatoria junto con la presencia de burbujas de gas en las aletas. La presencia y el tamaño de estas

burbujas de gas aumentó a medida que discurrían las horas experimentales. En las dos últimas horas experimentales, los peces aparecieron con movimientos erráticos, pérdida de flotabilidad junto con hemorragias graves y burbujas de gas en las aletas. En cuanto al gas score, el grupo EBG presentó cuatro localizaciones intravasculares con moda de gas score 5, dos de grado 4 y dos de grado 3. Las localizaciones extravasculares presentaron ambas modas de gas score 2, mientras que en el grupo control todas las puntuaciones fueron 0 (**Fig. 4**). Externamente, como hallazgos más relevantes, se observó enfisema subcutáneo, enfisema y hemorragia de aletas, así como hemorragias branquiales. Internamente, hiperinflación de vejiga natatoria, distensión por gas del bulbo arterioso y congestión multiorgánica fueron los hallazgos más frecuentes.

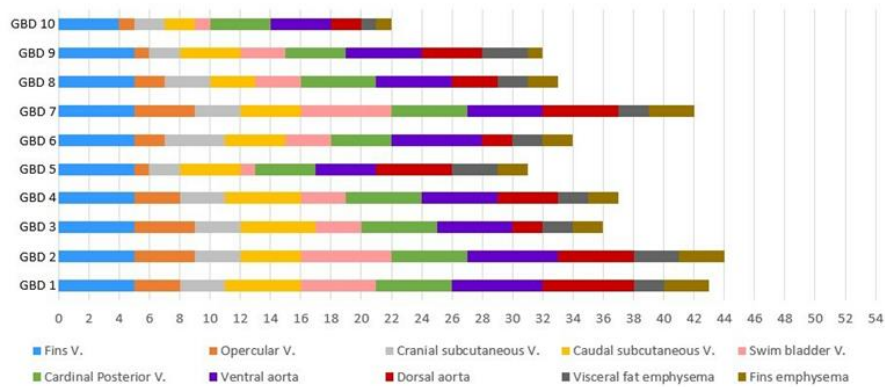


Figura 4. Puntuaciones de gas score obtenidas en las localizaciones intravasculares (0-6 puntos) y extravasculares (0-3) de cada pez del grupo EBG. También se muestra la puntuación total de gas score de cada pez.

Microscópicamente, se observó la congestión multiorgánica, así como enfisema y hemorragias en aletas, hemorragias y fusión de laminillas secundarias en branquias, dilatación de vasos sanguíneos y de túbulos renales del riñón posterior. Además, se visualizaron burbujas de gas abundantes en vasos sanguíneos de estos tres tejidos. En venas coronarias, de bazo, gónadas e hígado también se pudieron apreciar en menor medida estas estructuras, que no se tiñeron ni con H&E ni con Oil Red, confirmando que eran émbolos gaseosos y no grasos. En cuanto a los biomarcadores, HSP70 y HSP90 en branquias y corazón, así como HSP70 en riñón posterior y aorta ventral mostraron un aumento de expresión estadísticamente significativo en comparación con el grupo control. La ET-1 en el riñón posterior y aorta ventral, HSP90 en el riñón posterior y la ICAM-1 en las branquias presentaban una tendencia a incrementar su expresión, sin significancia estadística. Al correlacionar los marcadores con significancia estadística o tendencia a ésta con el gas score total, se observó que HSP70 en branquias tenía una correlación estadísticamente significativa. El estudio de poder estadístico determinó que los resultados de expresión de HSP70 en los cuatro tejidos, así como su correlación en branquias con el gas score total tenían un alto poder estadístico (>90%).

Los hallazgos patológicos de este estudio (**Fig. 5**) coinciden con estudios previos de este modelo (Velázquez-Wallraf et al., 2022) y otros estudios de EBG en peces (Pauley y Nakatani, 1967; Smith, 1988; Cao et al., 2015; Deng et al., 2020; Ji et al., 2021). Todos los animales EBG tenían gas score relativamente alto, aunque con cierta variabilidad. Se ha postulado que la variabilidad individual desempeña un papel determinante en las enfermedades que producen embolismo gaseoso (Shim et al., 1967; L'Abbate et al., 2010). La presencia de abundantes burbujas de gas vasculares sistémicamente distribuidas también se ha notificado en modelos experimentales de EDC (Eggleton et al., 1945; Lever et al., 1966; Tanoue et al., 1987; Arieli et al., 2009; L'abbate et al., 2010; Zhang et al., 2016; Tang et al., 2020), y en EDC no experimental en humanos (Caruso, 2003; Francis y Mitchell, 2003), cetáceos (Fernández et al., 2005; Bernaldo de Quirós et al., 2019) y tortugas marinas (García-Párraga et al., 2014). El gas score se ha utilizado como herramienta diagnóstica de embolia gaseosa (Bernaldo de Quirós et al., 2016a; Fernández et al., 2017; Velázquez-Wallraf et al., 2021), mostrando los animales afectados puntuaciones totales de gas elevadas, en concordancia con el presente estudio.

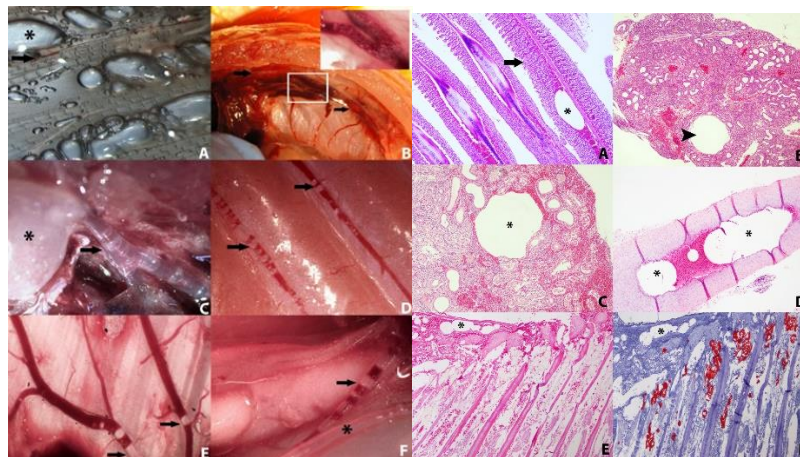


Figura 5. Hallazgos macroscópicos (izquierda; i) y microscópicos (derecha; d) en peces con EBG. Presencia de burbujas de gas en vasos sanguíneos como venas subcutáneas (i.D, i.E), aorta ventral (i.C, d.D), venas cardinales posteriores (i.B), vena de la vejiga natatoria (i.F), venas de la base de la holobranquia (d.E) o venas del riñón posterior (d.B, d.C). También se aprecia enfisema en aletas (i.A), fusión de laminillas secundarias en branquias (d.A).

Las burbujas de gas intravascular circulante desencadenan la activación del endotelio vascular, ampliamente descrito en enfermedades como EDC (Lambrechts et al., 2015; Wang et al., 2015). Esto genera una respuesta de estrés, provocando la puesta en escena de diferentes biomarcadores (Huang et al., 2003). Las HSPs son un mecanismo de defensa frente a estrés, especialmente térmico, oxidativo e hipóxico (Lindquist y Craig, 1988). La HSP70 mostró un patrón de aumento estadísticamente significativo de expresión en los cuatro tejidos estudiados del grupo EBG. Estos resultados concuerdan con estudios previos de expresión de HSP70 en pulmón, hígado y corazón de conejos (Su et al., 2004), y en pulmones de ratas (Huang et al., 2003). La expresión de HSP70 en los tejidos ha sido postulada por varios estudios como un biomarcador de estrés (Matsuo et

al., 2000; Domoto et al., 2016; Szyller et al., 2022). Por su parte, la HSP90 mostró un aumento estadísticamente significativo en branquias y corazón. La expresión de HSP90 tras estrés descompresivo no se ha visto significativamente aumentada, probablemente debido a que es constitutiva y sus niveles basales suelen permanecer elevados (Djurhuus et al., 2010; Fismen et al., 2012). En este estudio, este aumento podría explicarse por la severidad del embolismo gaseoso. Zhang et al. (2016) sugirieron que los elevados niveles de ET-1 en suero sanguíneo después de un estrés descompresivo podría ser una evidencia del estrés endotelial en la EDC. La ET-1 es el factor vasoconstrictor más potente conocido, siendo las células endoteliales su principal productor, aunque también otras como las células tubulares del riñón (De Miguel et al., 2016). En nuestro estudio, la ET-1 tuvo tendencia a aumentar su expresión en el riñón posterior y la aorta ventral de los peces con EBG, pero sin significancia estadística. Nuestros resultados podrían ser utilizados como premisas para probar si la ET-1 se eleva en suero sanguíneo y si este marcador fuera el mejor para inducir daño endotelial en embolismo gaseoso como sugieren Zhang et al. (2016).

La correlación de HSP70 en branquias con el gas score demuestra que el daño fue producido por las propias burbujas de gas. Las correlaciones restantes sin significancia podrían deberse a las limitaciones del estudio: pequeño tamaño muestral, naturaleza semicuantitativa del gas score y escasa variabilidad en gas score total. A pesar de ello, pudimos obtener un poder estadístico alto en los resultados de expresión de HSP70 en los 4 tejidos estudiados, así como de su correlación en branquias con el gas score total y resultados prometedores en el caso de la correlación de gas score con expresión de HSP70 en corazón y ET-1 en riñón posterior donde probablemente, con un tamaño muestral más amplio, los resultados hubiesen sido estadísticamente significativos tal y como muestra el estudio del poder estadístico. La limitación del tamaño muestral también es aplicable a la expresión de biomarcadores que, presentando tendencia al aumento de su expresión, no fueron estadísticamente significativos. El poder estadístico de estos biomarcadores indicó que la significancia estadística podría haberse alcanzado si se hubiese utilizado un tamaño muestral mayor. Además, para las muestras que no mostraron tendencia el efecto del tamaño muestral obtenido en el análisis de poder estadístico fue muy bajo, debiendo utilizar un número excesivo de animales para haber logrado tener significancia estadística, lo que sugiere que en estos marcadores no hay diferencia entre el grupo control y el grupo EBG. Este modelo de EBG podría ser un buen modelo para estudiar experimentalmente la embolia gaseosa y sus efectos de forma similar a otros animales tradicionales de laboratorio, siguiendo el principio de reemplazo de las 3Rs.

En conclusión, los peces con embolia gaseosa grave mostraron un aumento de HSPs, principalmente HSP70, y una correlación positiva con gas score de ésta en branquias. Nuestros resultados confirmaron que la HSP70 es un marcador fuerte de embolia gaseosa como se ha demostrado previamente, validando este modelo para el

estudio de la embolia gaseosa y sus efectos. Estos resultados validaron el modelo EBG para profundizar en el estudio de las vías fisiopatológicas de la embolia gaseosa, con la posibilidad de extrapolar los resultados a otras especies susceptibles.

1.3. CONCLUSIONES

1. Los hallazgos patológicos predominantes en conejos experimentales expuestos a un tratamiento severo de compresión y descompresión fueron embolismo gaseoso distribuido sistémicamente, enfisema y hemorragias en múltiples órganos vitales. Estas lesiones son similares a las descritas previamente en cetáceos con patología descompresiva, proporcionando más evidencias de esta patología y reforzando su diagnóstico en este grupo de animales.

2. Se reprodujo un modelo de enfermedad masiva y severa por burbujas de gas colocando a los peces en agua con 162-163% de saturación de gases totales disueltos durante 18 horas.

3. La presencia severa de burbujas de gas intravasculares y extravasculares generadas en el modelo de peces y las lesiones patológicas asociadas como hemorragias multiorgánicas están estrechamente relacionadas con las observadas en modelos experimentales de enfermedad descompresiva explosiva.

4. El embolismo gaseoso generado en el modelo experimental en peces modifica la expresión de diferentes marcadores de estrés o daño celular, siendo la HSP70 un potente marcador de este proceso.

5. El método del “gas score” se aplicó por primera vez en peces, y se confirmó como una herramienta útil, fácil y de bajo coste para exámenes postmortem de la presencia, distribución y abundancia de burbujas de gas intravasculares y extravasculares también en peces.

6. Los resultados experimentales de peces con EBG validan el uso de este modelo animal para el estudio de lesiones por burbujas de gas siendo una alternativa al uso tradicional de pequeños mamíferos aplicando el principio de reemplazo de las 3R's de la investigación.

7. En ambas especies, conejos y peces, los animales mostraron diferente severidad de embolismo gaseoso y lesiones relacionadas a pesar de haber sido expuestos a las mismas condiciones experimentales, demostrando que la variabilidad individual juega un papel fundamental en la enfermedad descompresiva, como se ha propuesto previamente en modelos animales y en la medicina del buceo humano.