

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**ESTUDIO MORFOLÓGICO DE BRANQUIAS DE ALEVINES
Salmo salar SOMETIDOS A HIPOXIA**

PAOLA SONIA PEÑAILILLO GONZÁLEZ

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
MENCIÓN MORFOLOGÍA**

**Director de Tesis:
Prof. Dra. Mariana Rojas Rauco**

2011

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

PAOLA SONIA PEÑAILILLO GONZÁLEZ

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis, como requisito para optar al Grado de **Magíster en Ciencias Biológicas** con **mención en Morfología**, en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 1 de Julio de 2011.

Prof. Dra. Mariana Rojas Rauco
Director de Tesis
Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo, ICBM
Facultad de Medicina, Universidad de Chile

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS

PROF. DR. MIGUEL CONCHA

PROF. DRA. GERALDINE LARROQUETTE

PROF. DR. DAVID LEMUS

PROF. DR. RICARDO OLIVARES

**CON AMOR A MIS PADRES,
A MI ESPOSO, COMPAÑERO Y AMIGO, MAXIMILIANO
Y A SEBASTIÁN, LA LUZ DE MI VIDA.**

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	5
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
3.1. GENERALIDADES	7
3.2. BRANQUIAS: ASPECTOS MORFOLÓGICOS Y FUNCIONALES	9
3.3. EFECTOS DE LA HIPOXIA EN EL DESARROLLO.	15
4. HIPÓTESIS	18
5. OBJETIVOS	19
6. MATERIALES Y MÉTODO	20
6.1. MATERIALES	20
6.2. MÉTODO	21
6.2.1. Técnicas utilizadas.	22
6.2.2. Análisis de resultados.	25
7. RESULTADOS	27
7.1 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA MACROSCÓPICA.	27
7.2 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA MICROSCÓPICA	28
7.3 REGISTROS MORFOMÉTRICOS MACROSCÓPICOS	31
7.3.1 Longitud corporal	31
7.4 REGISTROS MORFOMÉTRICOS MICROSCÓPICOS	32
7.4.1. Densidad de células mucosas en el epitelio branquial	32
7.4.2. Densidad de células con inmunomarcación (+) para HIF-1 α	34
7.4.3. Área vascular branquial	36
8. DISCUSIÓN	39
9. CONCLUSIONES	51
10. BIBLIOGRAFÍA	52
11. ANEXOS	62

1. RESUMEN

El objetivo de esta Tesis fue describir y comparar la morfología de las branquias de alevines *Salmo salar* desarrollados en un ambiente de normoxia (grupo control, en el que los ejemplares se mantuvieron en un contenedor con un 100% SatO₂ del agua), con la de alevines mantenidos en hipoxia (grupo T1, en el que la saturación de O₂ fue de un 75% y grupo T2, en el que este porcentaje fue de un 60%).

A partir del día 8 post eclosión y durante 7 días, los individuos se mantuvieron bajo las condiciones ya señaladas, realizándose muestreos diarios durante todo este periodo. Se registró la longitud corporal de todos los alevines muestreados.

Para la descripción macroscópica de las branquias, se utilizaron ejemplares tratados con la técnica de diafanización, mientras que la descripción histológica e histoquímica se realizó en cortes transversales de branquias teñidos con H&E/azul de Alcian y von Kossa, respectivamente. En base a la reacción con azul de Alcian, se hizo un recuento de las células mucosas presentes en el epitelio branquial.

Además, se realizó técnica inmunohistoquímica contra la proteína HIF-1 α (Factor Inducible por Hipoxia), para determinar la relación entre la presentación de alteraciones en las branquias y la exposición a hipoxia y, también, se usó el factor de von Willebrand (fvW) como marcador de células endoteliales, para cuantificar el área vascular branquial y determinar diferencias entre las condiciones de normoxia e hipoxia y su correlación con la inmunomarcación para HIF-1 α .

La longitud corporal de los individuos de los grupos T1 y T2 mostró una tendencia a disminuir al compararla con la de los respectivos controles, disminución que se hizo significativa ($p < 0,05$) a partir del día 5 del estudio, sólo en el grupo T2.

Respecto a las branquias, no encontramos diferencias en el desarrollo presentado por éstas al comparar los individuos del grupo control con los provenientes de ambos grupos expuestos a hipoxia. En todos ellos, se observaron cuatro pares de arcos branquiales de estructura cartilaginosa, con filamentos y laminillas poco desarrollados. La falta de calcificación de los cartílagos branquiales observada con la técnica de diafanización, fue confirmada con el resultado (-) a depósitos de calcio en los cortes histológicos teñidos con von Kossa, en todos los grupos y días analizados.

El epitelio de revestimiento de los arcos branquiales presentó un aspecto indiferenciado, con escasas células mucosas, cuya densidad aumentó en el tiempo y con la intensidad de la hipoxia, sin embargo, este aumento sólo presentó significancia estadística al comparar el grupo T2 con el grupo control, a partir del día 5 del periodo estudiado ($p < 0,05$).

Respecto a la densidad de células epiteliales HIF-1 α (+) y al área vascular de las branquias, sus valores promedio aumentaron progresivamente en el tiempo y con la intensidad del estímulo hipóxico, encontrándose una correlación alta ($r = 0,89$) y significativa ($p < 0,000$) entre ambas variables. Sin embargo, las branquias de los alevines del grupo control, siempre resultaron negativas para HIF-1 α , demostrando así, que éste es un buen indicador de la exposición a hipoxia por parte de estas estructuras.

Los resultados obtenidos sugieren, que las branquias de alevines *Salmo salar* no constituyen el sitio primario para el intercambio de gases durante esta etapa del desarrollo y que, ante una condición de hipoxia, evidencian cambios histológicos tempranos, que son coincidentes con una mayor inmunomarcación para HIF-1 α .

ABSTRACT

The aim of this Thesis was to compare the morphology of the gills of *Salmo salar* alevins developed in a normoxic medium (control group, where the alevins were placed on a recipient with a water saturation of 100% O₂) with the one of alevins maintained on hypoxia (group T1, where the O₂ saturation was 75%; and group T2, where the saturation was 60%).

From day 8 after hatching and during 7 days, the individuals were maintained on the previous signalled conditions, going on daily sampling. The body length of all alevins was registered.

To achieve the macroscopic description of the gills, individuals treated with the Hanken and Wassersug technique (1981) were used. The histological and histochemical descriptions were respectively achieved with transversal sections of gills tinted with H&E/Alcian blue and from von Kossa.

To determine the relationship within the presence of alterations in the gills and the hypoxia exposure, the immunohistochemistry technique against the HIF-1 α protein (Hypoxia Induced Factor) was achieved. The von Willebrand factor (vWf) was used as an endothelial cell marker to quantify the gill vascular area and determine differences between the normoxia and hypoxia conditions and its correlations with the immunomarking for HIF-1 α .

The body length of the alevins from T1 and T2 groups exhibit a tendency to decrease compared with the respective controls. This decrease was of significance from the day 5 of the study only on group T2 ($p < 0.05$).

No differences were found in the development of gills when comparing the individuals of control group with the ones of both groups maintained on hypoxia. In all of them, four branchial arches pairs of cartilaginous structure with low developed filaments and lamellae were found. The lack of calcification of the branchial cartilages was confirmed with the result (-) to calcium deposits in the histological cuts tinted with von Kossa in all the groups and all the days analyzed.

The branchial arches recovering epithelium showed an undifferentiated aspect with few mucous cells whose density increases with the time and the intensity of the hypoxia. However, this increase was of significance only when comparing the T2 group with the control group from the day 5.

Concerning the HIF-1 α (+) epithelial cells density and the gill vascular area, its mean values increased progressively with the time and the hypoxia stimulus, showing a high ($r=0,89$) and of significance ($p<0,000$) correlation between both variables.

The obtained results suggests that the gills of alevins are not the primary site for gases exchange during this development stage, and that in an hypoxia condition, they show early histological changes that does coincident with a higher expression of HIF-1 α .

2. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, Chile ha experimentado una rápida masificación y tecnificación de la salmonicultura, llegando a constituirse en uno de los principales países productores y exportadores de salmón y sus derivados (Méndez, 1997; Salmón Chile, 2008), siendo el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) las principales especies cultivadas en nuestro país (Salmón Chile, 2008).

Las nuevas tecnologías aplicadas en esta industria han logrado un aumento exponencial en las tasas de extracción, sin embargo, con la intensificación de las técnicas de cultivo también ha aumentado la incidencia de enfermedades que, en condiciones naturales, no revisten mayor importancia (Sadler y cols., 2001). Es así, como actualmente las anomalías morfo-anatómicas representan uno de los problemas más relevantes de la industria salmonera (Sfakianakis y cols., 2004), ya que pueden provocar la muerte de los peces afectados o alterar la calidad del producto final, disminuyendo de esta forma la rentabilidad del sistema (Sadler y cols., 2001; Gjerde y cols., 2005). Dentro de este grupo de patologías emergentes se puede mencionar el síndrome de deformidad mandibular, de deformidad vertebral, deformidad opercular y la deformidad branquial (Sadler y cols., 2001; Venegas y cols., 2003).

Las branquias tienen una organización compleja, que es similar en la mayoría de los teleósteos, y están involucradas en el intercambio de gases, equilibrio ácido-base, osmorregulación y regulación iónica. Además, su estrecho contacto con el agua las hace muy sensibles a las condiciones ambientales y pueden experimentar cambios patológicos mediados por agentes infecciosos (Diler y Cinar, 2009; Mir y

Channa, 2009) y situaciones de estrés para los peces, como contaminación, desbalances nutricionales, calor e hipoxia (Crespo y cols., 1988), de tal forma que la morfología de estas estructuras es un buen indicador de la calidad del agua y de las condiciones sanitarias del sistema productivo.

Considerando la naturaleza multifuncional de las branquias y que, durante la etapa de alevín, los salmónidos son mantenidos en tanques con una elevada densidad poblacional, lo que constituye un factor de riesgo para experimentar estados de hipoxia transitoria, es que el objetivo del presente trabajo fue describir y comparar la morfología de las branquias de alevines *Salmo salar* desarrollados en un ambiente de normoxia, con la de alevines de la misma especie expuestos a distintas intensidades de hipoxia.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. GENERALIDADES.

Debido al gran número de especies de peces existentes, sobre 25.000, es que se han desarrollado distintos sistemas de clasificación para describir la gran diversidad de etapas identificadas en su ciclo de vida, cada uno de los cuales difiere en la terminología empleada. La clasificación más simple reconoce una etapa de huevo que, al eclosionar, da origen a una larva, que por metamorfosis llega a la etapa juvenil (Helfman y cols., 1997).

El interés productivo en *Salmo salar*, ha llevado a realizar un estudio detallado de las fases de su ciclo de vida, que incluye eclosión y vida juvenil en agua dulce, crecimiento y maduración en el océano y finalmente el retorno a su hábitat de río para reproducirse y morir. Las etapas descritas en su desarrollo son: **ova o huevo** (etapa previa a la eclosión y altamente sensible a factores ambientales como estrés térmico e hipoxia); **alevín** (etapa post eclosión caracterizada por la presencia de saco vitelino); **fry** (individuo que ha reabsorbido el saco vitelino y, por lo tanto, es dependiente de fuentes exógenas de alimento); **parr** (estado juvenil que permanece entre 1 y 4 años en agua dulce); **smolt** (etapa de transición entre la vida en agua dulce y salada); **animal marino** (estado juvenil previo a la madurez, en que se ha completado el proceso de *smoltificación*); **grilse** (animal que retorna a su hábitat de río por primera vez, para reproducirse); **salmón** (animal que retorna a su hábitat de río después de haber permanecido por más de un invierno en el océano o, también, aquel animal que ha sobrevivido al primer retorno y nuevamente vuelve a su hábitat de agua dulce para reproducirse) y **kelts** (animal que sobrevive al retorno

reproductivo, permanece en el río durante el invierno y vuelve al océano en primavera) (Helfman y cols., 1997; Huysseune y cols., 2007).

Si usamos como modelo del desarrollo embrionario de salmónidos a la trucha arco iris, la eclosión ocurre 30 días post fecundación si las ovas son mantenidas a 10°C, gracias a la producción de enzimas proteolíticas por parte del embrión, permitiendo la liberación del ahora alevín, cuya característica externa más destacada es la presencia de saco vitelino. Además, en esta etapa aparecen los filamentos branquiales y el opérculo cubre las branquias (Estay y cols., 1994).

En las pisciculturas, la eclosión es un momento clave desde el punto de vista del manejo, ya que las necesidades de oxígeno de los alevines son superiores a las de las ovas embrionadas (Estay y cols., 1994). Al momento de la eclosión, los alevines de saco de la mayoría de las especies de peces tienen branquias poco desarrolladas, por lo que la captación de oxígeno es realizada fundamentalmente a través de la superficie corporal. Sin embargo, con el progreso del desarrollo, la difusión de oxígeno a través de la piel no satisface los requerimientos metabólicos de los individuos, por lo que la importancia de la respiración cutánea disminuye y las branquias llegan a ser el sitio primario de intercambio de gases (Wells y Pinder, 1996_b; Rombough, 1998; Jonz y Nurse, 2006; Mir y Channa, 2009).

Rombough y Ure (1991), al comparar la distribución de la captación de oxígeno entre las superficies cutánea y branquial en ejemplares de salmón Chinook mantenidos a 12°C, encontraron que al momento de la eclosión, más del 84% de la captación de oxígeno se realiza a través de la piel, sin embargo, en la mitad de la etapa de alevín, este porcentaje cae a un 50%, llegando a un 30% en la etapa de fry.

Resultados similares fueron publicados por Wells y Pinder (1996_b), quienes estudiaron la distribución de la captación de oxígeno en alevines *Salmo salar* desde la eclosión hasta el estado juvenil. Estos autores encontraron que en individuos recién eclosionados, el 92% de la respiración es cutánea, observándose escaso desarrollo de las branquias en esta etapa. Sin embargo, la superficie branquial aumenta drásticamente en el tiempo, registrando valores promedio de $9,4 \pm 2,6 \text{ mm}^2$ al momento de la eclosión y de $189,0 \pm 6,0 \text{ mm}^2$ al momento en que se completa la reabsorción del saco vitelino, etapa en que el 32% de la captación de oxígeno es cutánea. Este incremento de la superficie branquial, al comparar ambos momentos del desarrollo, sería resultado del aumento en el número de filamentos y laminillas branquiales.

3.2. BRANQUIAS: ASPECTOS MORFOLÓGICOS Y FUNCIONALES.

3.2.1. Organización Anatómica.

El desarrollo de los peces, desde la etapa embrionaria al estado juvenil, implica muchas transformaciones morfológicas y fisiológicas y, una de las más importantes, es la transferencia de la función de captación de oxígeno desde la superficie cutánea hacia las branquias (Jonz y Nurse, 2006; Mir y Channa, 2009). Sin embargo, como los peces no están en equilibrio osmótico con el ambiente acuático, éstas no sólo funcionan como órganos de intercambio de gases respiratorios sino que también como órganos osmorreguladores, participando activamente del transporte iónico, la excreción de residuos nitrogenados y el mantenimiento del equilibrio ácido-base (Eckert, 1992).

Las branquias de los teleósteos comprenden dos series de cuatro holobranquias, que forman las paredes de la faringe. Cada holobranquia se compone de dos hemibranquias que se proyectan desde el borde posterior del arco branquial, de tal forma que los bordes libres divergen y tocan a las holobranquias adyacentes (Kinkelin y cols., 1991; Mir y Channa, 2009).

Las hemibranquias están formadas por laminillas primarias o filamentos, que se proyectan desde el arco hacia el exterior y cuya superficie aumenta por la formación de repliegues denominados laminillas secundarias, que se disponen regularmente sobre toda la superficie dorsal y ventral de los filamentos. Esta organización forma, sobre las dos caras de la faringe, un doble filtro a través del cual el agua fluye continuamente. Es este estrecho contacto con el agua lo que hace a las branquias estructuras vulnerables, expuestas a sufrir daño por agentes patógenos e irritantes químicos que se encuentren disueltos o en suspensión en el agua (Kinkelin y cols., 1991; Mir y Channa, 2009) (Figuras 1a, b y c).

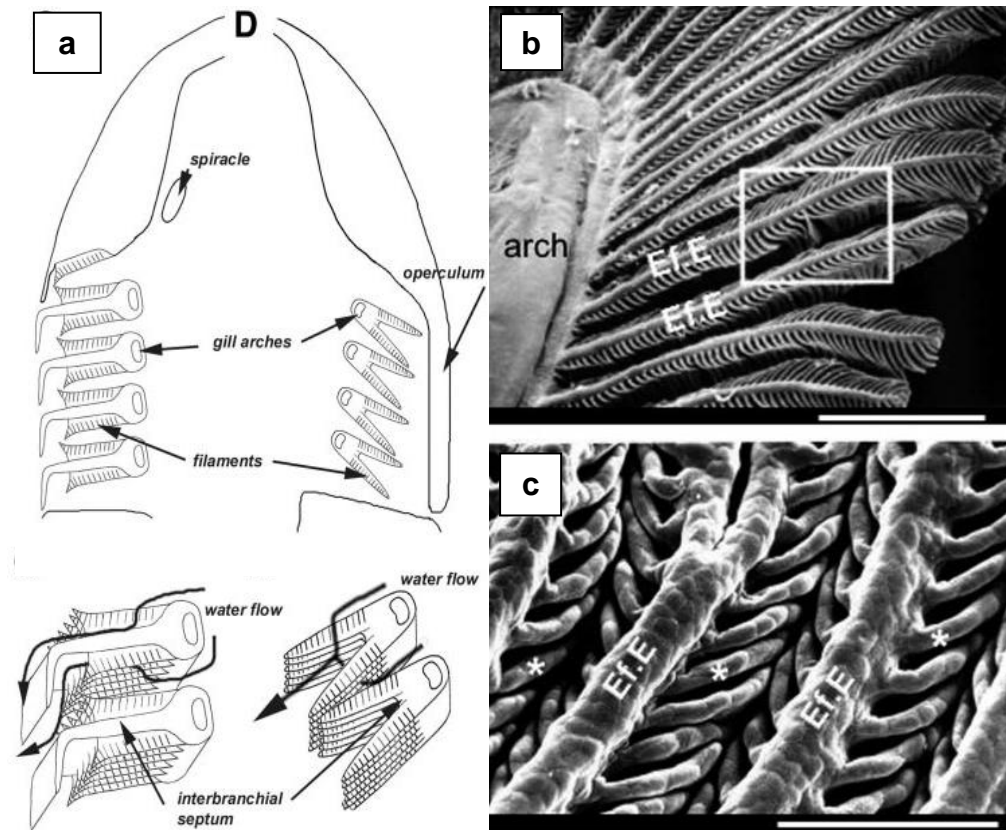


Figura 1: a) Representación esquemática de las branquias de un teleósteo. D: apertura oral. b) y c) Microfotografías de branquias de teleósteos. arch: arco branquial; Ef.E: filamentos; *: laminillas branquiales. Tomado de Evans y cols., 2005.

Al igual que en trucha arco iris, en la trucha *Schizothorax curvifrons* las laminillas secundarias se distribuyen en ángulo recto desde el eje longitudinal de los filamentos y son paralelas entre sí, constituyéndose en la estructura más importante del sistema branquial desde el punto de vista del intercambio de gases, al aumentar la superficie epitelial de los filamentos, lo que resulta en una pequeña distancia de difusión del oxígeno entre la sangre y el agua que pasa por estas estructuras (Mir y Channa, 2009).

La sangre que irriga las branquias fluye a lo largo de dos vías principales: los vasos aferentes y eferentes del interior del filamento y de las laminillas secundarias (Eckert, 1992). El número de arterias branquiales aferentes, que conducen sangre

desoxigenada hacia las branquias desde la aorta ventral, varía entre los distintos grupos de peces, pero la mayoría de los condictíos y peces óseos poseen cuatro. Por su parte, las arterias branquiales eferentes llevan sangre oxigenada desde las branquias al resto del cuerpo y se fusionan para formar la aorta dorsal, que es la arteria de mayor calibre del cuerpo de los peces. El número de arterias eferentes es de una por cada hemibranquia en peces condictíos y de una por cada holobranquia en teleósteos (Helfman y cols., 1997) (Figura 2).

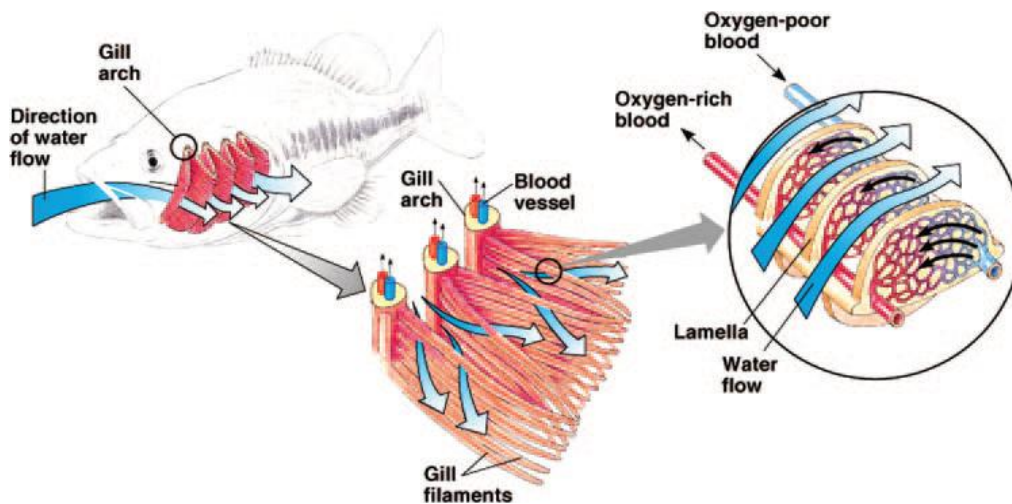


Figura 2: Representación esquemática del flujo de agua y sangre a través de las branquias.
Tomado de Evans y cols., 2005.

3.2.2. Características Histológicas del Epitelio Branquial.

En teleósteos, las principales células que forman el epitelio que reviste los filamentos son, desde la capa más interna a la más externa, células indiferenciadas, células del cloruro, células mucosas y células pavimentosas (Fernández y Perna-Martins, 2001; Diler y Cinar, 2009; Mir y Channa, 2009; Morón y cols., 2009). Estas últimas son las más abundantes (90%), miden 3 a 5 μm de grosor, tienen forma poligonal y límites definidos, pero su principal característica es la presencia de

proyecciones apicales que aumentan el área de interacción entre la superficie celular y el medio acuático, de modo que están directamente relacionadas con el intercambio de gases. Además, poseen escasas mitocondrias, un retículo endoplásmico rugoso desarrollado y un aparato de Golgi que produce microvesículas glicoproteicas. Cuando estas vesículas se fusionan con la membrana celular apical, las glicoproteínas son descargadas hacia la superficie celular y van a formar parte del glicocálix o capa mucosa (Eckert, 1992; Matey y cols., 2008; Diler y Cinar, 2009).

Las células del cloro son grandes y redondas, poseen un gran número de mitocondrias y participan en la regulación iónica y osmótica. En teleósteos de agua dulce, que son hiperosmóticos respecto a su ambiente y, por lo tanto, tienden a ganar agua y perder sales por difusión a través de las branquias y faringe, se excretan grandes volúmenes de orina diluida y se transportan sales activamente hacia la sangre, lo que es realizado por estas células. En cambio, los teleósteos marinos, enfrentados a la situación opuesta, para evitar la deshidratación a que están expuestos beben agua salada y de forma activa excretan el exceso de sales. En este caso, iones monovalentes como Na^+ y Cl^- son excretados por las células del cloruro, mientras que iones como magnesio y sulfato, son excretados por la orina (Helfman y cols., 1997; Fernández y Perna-Martins, 2001; Diler y Cinar, 2009; Mir y Channa, 2009; Morón y cols., 2009).

Por su parte, las células mucosas son esféricas, presentan un núcleo basal y numerosas vesículas de secreción de diferente diámetro en el citoplasma. Este tipo celular secreta un mucus que contiene glicoproteínas ácidas, neutras y sulfatadas y participa en la defensa contra contaminantes y parásitos, evita la deshidratación y

regula la difusión de iones (Fernández y Perna-Martins, 2001; Diler y Cinar, 2009; Mir y Channa, 2009; Morón y cols., 2009). Esta secreción podría ser un mecanismo de adaptación a diferentes condiciones del medio acuático, pues se han observado cambios en el número de estas células, en branquias y piel, como respuesta a modificaciones en la concentración de Na^+ , Ca^+ y Cl^- en el agua (Morón y cols., 2009).

A diferencia del epitelio que reviste los filamentos branquiales, el epitelio respiratorio o laminillar posee sólo dos capas de células, que consisten en una capa de células pavimentosas en el lado más externo y células indiferenciadas en el más interno (Morón y cols., 2009).

La distribución y morfología de las células del epitelio branquial varía según si el pez habita en un ambiente marino o de agua dulce (Bettex-Galland y Hughes, 1973; Fernández y Perna-Martins, 2001). Lo mismo ocurre con la dirección del transporte de sales a través del epitelio branquial en las especies que migran entre el agua dulce y el agua marina, pues como se mencionó anteriormente, en el hiposmótico ambiente de agua dulce es la pérdida de iones el principal problema, mientras que en el hiperosmótico ambiente marino la retención de agua es el mayor problema. Es así como, por ejemplo, la exposición a salinidades elevadas produce un aumento en el número de células de cloruro y de la actividad de las ATPasas activadas por Na^+ y K^+ (Helfman y cols., 1997).

De esta forma, la estructura de los órganos respiratorios debe equilibrar las necesidades del intercambio de gases con la regulación del flujo de iones y agua (Sollid y cols., 2003), lo que es controlado a través de mecanismos endocrinos que afectan la diferenciación y el metabolismo epitelial, de tal forma que el cortisol está

implicado en los cambios inducidos por la transición a agua de mar, mientras que la prolactina interviene en los cambios que acompañan la transferencia a agua dulce (Eckert, 1992).

3.3. EFECTOS DE LA HIPOXIA EN EL DESARROLLO.

El ambiente acuático se caracteriza por presentar una marcada heterogeneidad temporal y espacial en la disponibilidad de oxígeno. La cantidad de oxígeno contenida en un volumen determinado de agua es sólo 1/30 parte de la contenida en el mismo volumen de aire. Además, en la medida que la temperatura y el contenido de sales aumenta, la cantidad de oxígeno que puede ser disuelta en el agua disminuye. Por último, la tasa de difusión del oxígeno en el agua es 10.000 veces más lenta que en el aire (Helfman y cols., 1997; Nikinmaa y Rees, 2005).

Pese a esto, los vertebrados acuáticos requieren una disponibilidad adecuada de oxígeno en todas las etapas de su desarrollo, como se ha demostrado en embriones y estados larvarios tempranos de peces y anfibios (Padilla y Roth, 2001; Jonz y Nurse, 2006). Se ha observado que algunos embriones acuáticos se adaptan a esta condición de hipoxia relativa aumentando los movimientos corporales, estrategia que busca generar un gradiente de difusión para el intercambio de gases respiratorios a través de la piel y, de esta forma, mantener el flujo de oxígeno hacia el embrión. Es así, como en embriones *Salmo salar* se aprecian contracciones espontáneas del tronco a partir de los 27 días post fecundación (dpf), en embriones de trucha arco iris, movimientos de la región caudal a los 20 dpf y, en pez cebra, rápidos movimientos de las aletas pectorales a los 2 dpf (Jonz y Nurse, 2006; Ciuhandu y cols., 2007). Junto con esto, en larvas de teleósteos se han registrado,

durante la exposición a hipoxia, movimientos esporádicos de las branquias, que están coordinados en forma precisa con el movimiento de las aletas pectorales (Jonz y Nurse, 2006).

A pesar de estas respuestas adaptativas, la mayoría de los peces durante su vida temprana son muy sensibles a bajos niveles de oxígeno disuelto, sensibilidad que varía según la etapa del desarrollo (Shang y Wu, 2004; Jonz y Nurse, 2006; Podrabsky y cols., 2007).

Se ha demostrado que, en los peces, la hipoxia retarda el crecimiento, el desarrollo gonadal, induce apoptosis, reduce el éxito de la fertilización y de la eclosión y la supervivencia de las larvas y que, niveles subletales de hipoxia, pueden incrementar en más de un 77% la presentación de malformaciones durante el desarrollo embrionario (Shang y Wu, 2004).

El requerimiento de oxígeno para el desarrollo exitoso de embriones y larvas de salmónidos, se ha estimado en un rango cercano al 90% de saturación, dependiendo de la temperatura, etapa del desarrollo y tasa de flujo del agua alrededor del embrión (Ciuhandu y cols., 2007); pero ya sea por la densidad poblacional de los estanques de cultivo, por inadecuados porcentajes de saturación de oxígeno en el agua o por una deficiente recirculación de ésta, los niveles de oxígeno pueden variar ampliamente en el ambiente acuático de una planta salmonera, afectando a los organismos que en él viven. Esta situación se debe tener presente ya que, después de la eclosión, los alevines *Salmo salar* suelen mantenerse en contenedores con una elevada densidad poblacional, factor de riesgo para experimentar alzas de temperatura o estados de hipoxia (Sfakianakis y cols., 2004; Huysseune y cols., 2007).

Como se mencionó anteriormente, los peces han desarrollado mecanismos de adaptación a los ambientes hipóxicos. La vía del Factor Inducible por Hipoxia (HIF-1) es un sistema regulador de la expresión génica dependiente de los niveles de oxígeno (Semenza, 2000; Vuori y cols., 2004; Rojas y cols., 2007; Rytönen y cols., 2007), que media las respuestas adaptativas a la hipoxia a través de la expresión de los genes que transcriben, entre otros, para eritropoyetina y el factor de crecimiento endotelial-vascular (VEGF), aumentando de esta forma, el transporte sistémico de oxígeno y la vascularización local (Nikinmaa y Rees, 2005; Zarembek y Malech, 2005; Nanka y cols., 2006).

HIF-1 es un heterodímero compuesto por dos subunidades proteicas, HIF-1 α y HIF-1 β . La expresión de la subunidad β es constitutiva, mientras que en normoxia, HIF-1 α es hidroxilado sobre residuos de prolina y asparragina mediante un mecanismo dependiente de oxígeno, siendo rápidamente degradado por el sistema ubiquitina-proteosoma, lo que determina la inactivación de HIF-1. En cambio, en condiciones de hipoxia aumentan los niveles de HIF-1 α , que se acumula en el núcleo de las células, determinando la funcionalidad de HIF-1 (Hochachka y Lutz, 2001; Zarembek y Malech, 2005; Law y cols., 2006; Rojas y cols., 2007) (Figura 3).

De esta forma, los distintos sistemas de detección de HIF-1 α son buenos predictores para determinar si los tejidos en estudio han sido expuestos a bajas concentraciones de oxígeno.

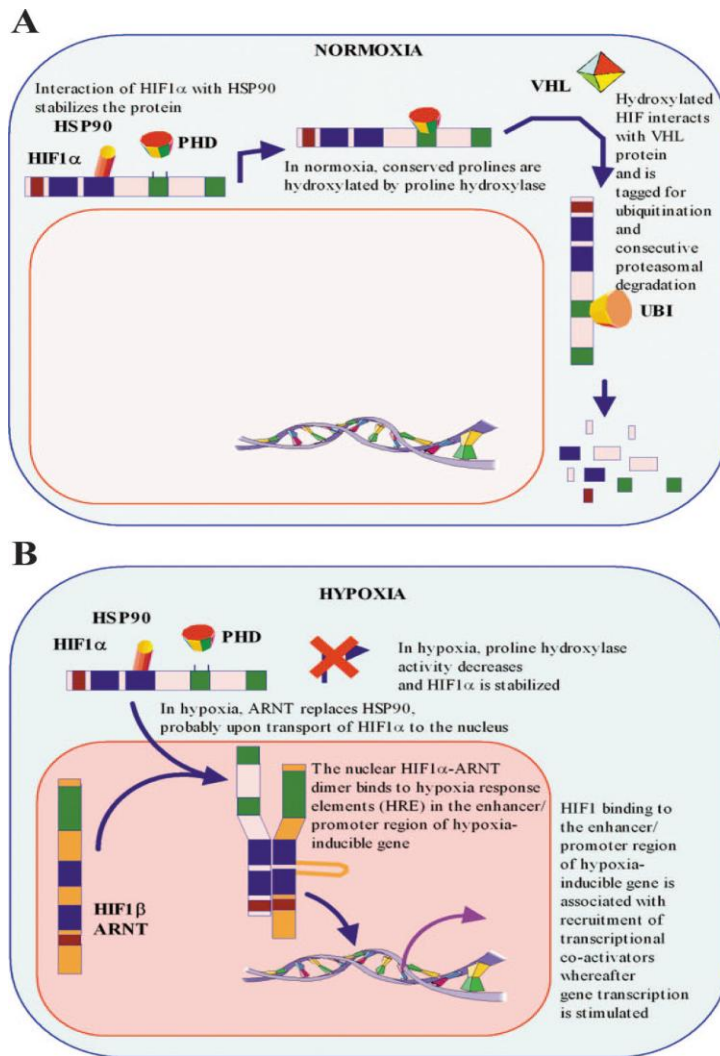


Figura 3: Representación esquemática de la función del Factor Inducible por Hipoxia (HIF-1). A: normoxia. B: hipoxia. Tomado de Nikinmaa y Rees, 2005.

4. HIPÓTESIS

Las branquias de alevines *Salmo salar* expuestos a hipoxia, presentan cambios morfo-funcionales en relación a aquellas provenientes de ejemplares mantenidos en un ambiente de normoxia.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Describir las características morfológicas de las branquias de alevines *Salmo salar* que se desarrollan en un ambiente de normoxia, y compararlas con las de individuos sometidos a hipoxia.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Describir la morfología macroscópica de las branquias de alevines *Salmo salar* en condiciones de normoxia e hipoxia.
- 2.- Comparar las características histológicas de las branquias de alevines *Salmo salar* en condiciones de normoxia e hipoxia.
- 3.- Cuantificar la densidad de células mucosas del epitelio branquial de los ejemplares y establecer si existen diferencias significativas entre las condiciones de normoxia e hipoxia.
- 4.- Cuantificar y comparar el área vascular de las branquias de los grupos normóxico e hipóxicos.
- 5.- Determinar si existe una asociación entre la presencia de cambios estructurales en las branquias y la expresión del marcador de hipoxia HIF-1 α .

6. MATERIALES Y MÉTODO

6.1. MATERIALES

Este estudio se realizó en 315 ejemplares de la especie *Salmo salar*, de la misma edad y estado del desarrollo (alevines con saco vitelino y 7 días post eclosión). Para poder contar con un grupo homogéneo de individuos, éstos se obtuvieron a partir de ovas en estado de ojo, provenientes de una empresa salmonera del sur de Chile, las que fueron incubadas hasta su eclosión en el Centro de Estudios Acuícolas y Piscicultura Experimental de la Universidad de Chile, ubicado en la ciudad de Castro, Chiloé (Figura 4).



Figura 4: Instalaciones del Centro de Estudios Acuícolas de la Universidad de Chile. Castro, Chiloé.

Las ovas fueron mantenidas bajo condiciones ambientales estándar para el rubro, es decir, en estanques con agua circulante proveniente de vertiente (Figura 5), con temperatura promedio de 10°C y una saturación de oxígeno del 100% (normoxia), que se controló a través del manejo del flujo de agua, realizando 6 mediciones diarias utilizando el dispositivo OxiGuard®.



Figura 5: *Circulación del agua: a) Vertiente de origen; b) Estanques de distribución al interior de las salas de incubación; c) Contenedores donde se mantuvieron los alevines. El agua les fue provista por un sistema de cañerías, mediante alimentadores regulados por llaves de paso que permiten controlar el flujo del agua y, de esta manera, la saturación de oxígeno.*



6.2. MÉTODO

A partir del día 1 post eclosión, y durante 7 días, los alevines se mantuvieron bajo las condiciones ya señaladas pero, a partir del día 8 post eclosión, que se consideró el día 1 del periodo experimental, fueron divididos en 3 grupos:

Grupo C: grupo control constituido por 105 individuos que se mantuvieron en condición de normoxia durante 7 días (agua con 100% SatO₂). Diariamente, se muestrearon 15 individuos para la realización de distintas técnicas morfológicas.

Grupo T1: formado por 105 individuos que, durante 7 días, se mantuvieron bajo una condición de hipoxia equivalente a un 75% SatO₂ del agua. De este grupo, se muestrearon 15 individuos por día, durante los 7 días que duró el estudio.

Grupo T2: formado por 105 individuos que, durante 7 días, se mantuvieron bajo una condición de hipoxia equivalente a un 60% SatO₂ del agua. Se muestrearon 15 alevines diariamente durante el periodo de estudio.

Al momento de la recolección, los alevines fueron anestesiados con Benzocaína 5% (BZ-20®, Veterquímica) disuelta en el agua y se evaluaron sus características macroscópicas para descartar la presencia de alguna patología. Posteriormente, fueron fijados en formalina tamponada al 10%, solución en la que permanecieron por un período no superior a 48 horas. Previo a su procesamiento, se registró la longitud corporal de todos los ejemplares muestreados.

6.2.1. TÉCNICAS UTILIZADAS.

DIAFANIZACIÓN.

Fueron procesados mediante la técnica de diafanización, según el protocolo propuesto por Hanken y Wassersug (1981) (anexo 1), cinco de los individuos muestreados diariamente, provenientes de los tres grupos del estudio.

Esta técnica, combina digestión proteica en base a tripsina con la utilización de dos colorantes: Alizarina, que tiñe de color rojo las sales de calcio presentes en los tejidos osificados y azul de Alcían, que da una coloración azul a los glicosaminoglicanos y, por lo tanto, permite observar cartílago hialino.

Los ejemplares diafanizados fueron observados en una lupa estereoscópica (Stemi DV4, Zeiss) para evaluar el desarrollo y organización estructural de las branquias, y luego fotografiados en formato digital con cámara adaptada a la lupa (Canon A-640, 10 Megapíxeles).

TÉCNICAS HISTOLÓGICAS E HISTOQUÍMICAS.

De los alevines no diafanizados, provenientes de los 3 grupos en estudio, se obtuvieron sus cabezas, las que fueron procesadas e incluidas en parafina para realizar cortes transversales de 5 μm de grosor de la región branquial, que luego fueron montados en portaobjetos albuminados para su tinción.

De cada individuo, se tomó uno de cada diez cortes hasta completar un total de 10 cortes por portaobjeto y un total de 2 portaobjetos, los que fueron procesados mediante técnicas histológicas (H&E/azul de Alcian) e histoquímica (von Kossa), respectivamente:

H&E/azul de Alcian pH 2,5: permite observar la disposición general de los tejidos y el depósito de glicosaminoglicanos. Además, en estos cortes se cuantificó el número de células mucosas presentes en el epitelio branquial, para determinar su densidad, comparando las muestras control con las provenientes de alevines sometidos a hipoxia.

Reacción de von Kossa: reconoce el depósito de calcio en los tejidos mediante la sustitución del Ca^{++} por Ag, debido a que ésta se une a la parte aniónica de las sales de calcio (fosfatos o carbonatos), generando un compuesto de color amarillo que,

expuesto al sol o a la luz, adquiere un color negro por reducción de la Ag (Kiernan, 2008).

Los tejidos se observaron en microscopio de luz (Axiostar Plus, Zeiss) y fueron fotografiados digitalmente (Canon A-640, 10 Megapixeles).

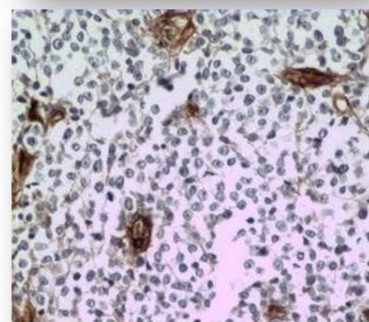
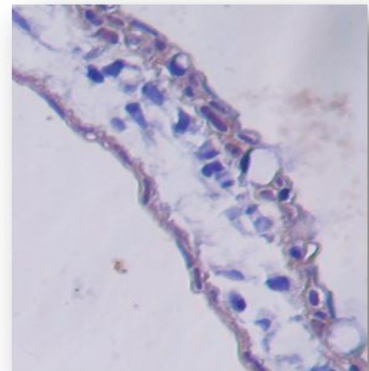
TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS.

Los cortes obtenidos a partir de las cabezas de los alevines no diafanizados, también se montaron en portaobjetos xilanizados, para la realización de técnicas inmunohistoquímicas. En este caso, se tomó uno de cada diez cortes hasta completar un total de 5 cortes por portaobjeto y un total de 2 portaobjetos xilanizados por individuo.

Los anticuerpos empleados fueron:

- a) Para la detección del factor HIF-1 α , se utilizó el Ac primario policlonal anti-HIF-1 α (H-206, Santa Cruz Biotechnology 10790) 1:100 (anexo 2).

- b) Para la detección de endotelios, se utilizó el Ac primario policlonal anti-factor de von Willebrand (fvW) (DAKO Code No A 0082) 0,5:1000 (anexo 3).



En ambos casos, se utilizó un Ac secundario biotinilado universal (Vector) y para amplificar la reacción se agregó un conjugado estreptavidina-peroxidasa. La reacción enzimática se reveló con sustrato/cromógeno DAB (Vector).

El control negativo, para ambas técnicas, estuvo dado por el desarrollo de la técnica inmunohistoquímica completa, pero sin considerar el anticuerpo primario.

6.2.2. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

Los resultados obtenidos mediante las técnicas histológica, histoquímica y de diafanización, se utilizaron para realizar la descripción de la organización estructural de las branquias, comparando el desarrollo alcanzado por éstas en los alevines del grupo control, con el presentado por los individuos que se sometieron a condiciones de hipoxia.

En los cortes montados en portaobjetos albuminados y teñidos con H&E/azul de Alcían, se realizó el recuento del número de células mucosas presentes en el epitelio branquial, obteniéndose la densidad promedio de estas células (n° cel/ μm^2) en cada individuo y para cada día del estudio, tanto en el grupo C como en los grupos T1 y T2. Para esto, las muestras se observaron en un microscopio de luz (Axiostar Plus, Zeiss) con objetivo 40X y se fotografiaron por medio de una cámara (Canon A-640, 10 Megapíxeles) adaptada a dicho microscopio.

Siguiendo el mismo procedimiento, se obtuvo la densidad promedio de células epiteliales con inmunomarcación (+) para HIF-1 α (n° cel/ μm^2) para cada individuo y día del estudio, en los tres grupos mencionados. En este caso, se utilizaron los cortes montados en portaobjetos xilanizados tratados con anticuerpo anti-HIF-1 α .

Para cuantificar el área vascular (μm^2), se utilizaron las imágenes digitales obtenidas de los cortes montados en portaobjetos xilanizados tratados con anticuerpo anti-fvW. Empleando el software Image Tool 3.0 [en línea] (UTHSCSA, 2002), se cuantificó el área positiva a la inmunotinción para fvW, obteniéndose de

esta forma los valores promedio para cada individuo y día del estudio, tanto en el grupo control como en los dos grupos mantenidos en hipoxia.

Los valores obtenidos para las variables cuantitativas estudiadas (longitud corporal, densidad de células mucosas en el epitelio branquial, densidad de células epiteliales inmunomarcadas para HIF-1 α y área vascular), fueron procesados con el software Minitab 15.0 y descritos a través de la media aritmética y la desviación estándar.

Además, se realizó una prueba ANDEVA entre medias de muestras independientes y el test de comparaciones múltiples de Tukey, con el fin de establecer si las diferencias encontradas poseían significancia estadística y, por último, se calcularon coeficientes de correlación de Pearson (r) para ver la relación existente entre aquellas variables consideradas como más relevantes.

Se consideró un error α del 5% en todas las pruebas estadísticas empleadas.

Los resultados fueron tabulados y graficados.

7. RESULTADOS

7.1 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA MACROSCÓPICA.

En todos los individuos estudiados, procesados mediante la técnica de diafanización (Hanken y Wassersug, 1981), se observaron 4 pares de arcos branquiales de estructura cartilaginosa, sin encontrarse indicios del comienzo del proceso de osificación, pues la matriz se observó de color azul, característico de la presencia de glicosaminoglicanos. Esta misma situación se observó en todo el esqueleto de los ejemplares analizados (Figuras 6a y 6b).

Considerando que estos alevines tenían entre 8 y 14 días post-eclosión, resulta interesante destacar el poco desarrollo macroscópico observado en las branquias, en las que no fue posible visualizar la presencia de filamentos branquiales mediante esta técnica. Como referencia, en las Figuras 6c y 6d se puede observar el desarrollo alcanzado por las branquias en un ejemplar de la misma especie (*S. salar*) a los 2 meses post-eclosión, en las que claramente se distinguen las laminillas primarias que se proyectan a partir de cada arco.

La observación de los arcos branquiales fue facilitada por la presencia de opérculos transparentes y mesenquimáticos, los que tampoco mostraron indicios de osificación durante el periodo estudiado.

No se encontraron diferencias, en las características anatómicas de las branquias, al comparar los ejemplares del grupo control con los pertenecientes a los grupos expuestos a hipoxia, en ninguno de los días que comprendió este estudio.

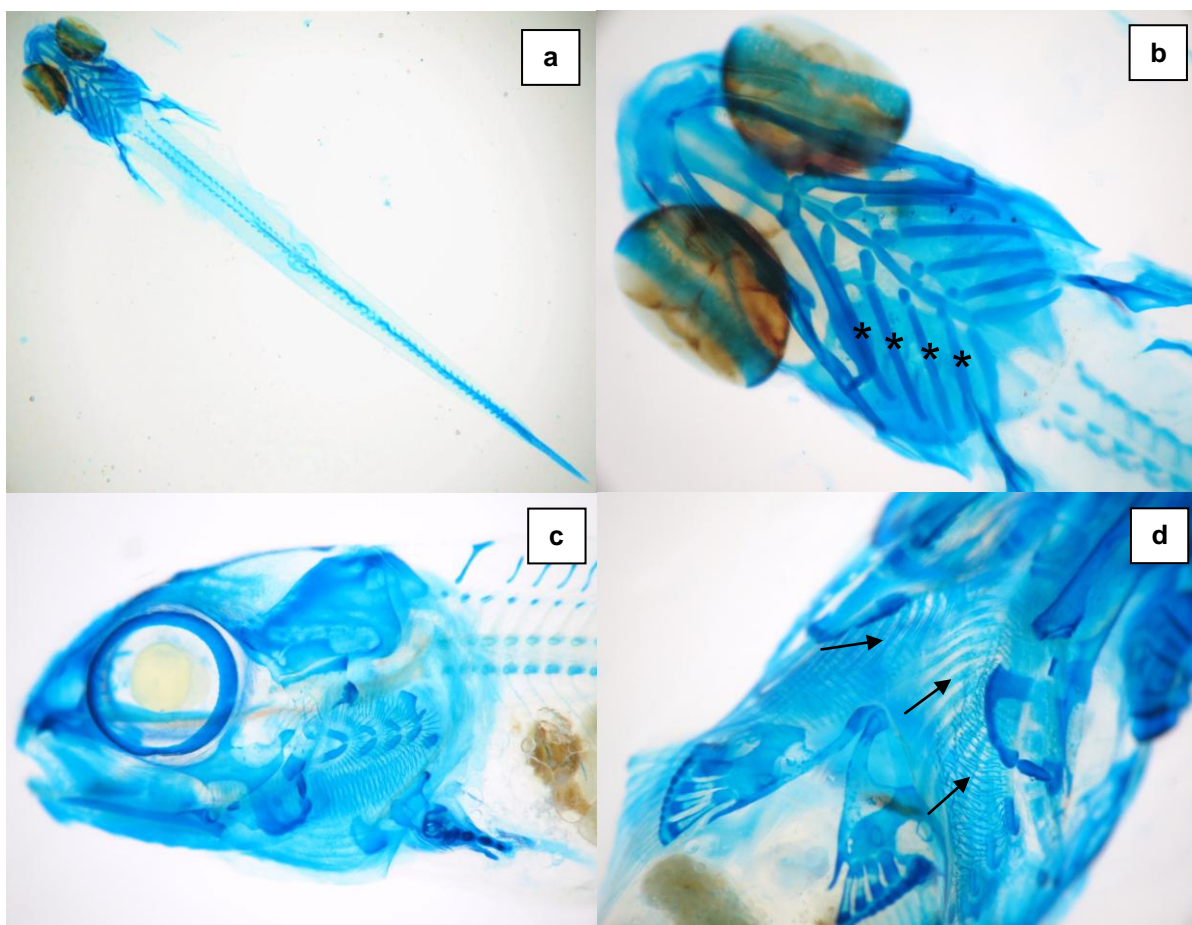


Figura 6: a) Vista general de alevín perteneciente al grupo C, día 4 del estudio, 8x; b) Vista ventral de los arcos branquiales (*) del ejemplar anterior, 32x; c) Alevín *S. salar* de aprox. 2 meses post eclosión, vista lateral del cráneo y branquias, 16x; d) Vista ventral de las branquias del mismo individuo. Nótese el desarrollo de los filamentos branquiales (flechas), 20x. Técnica de diafanización.

7.2 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA MICROSCÓPICA.

En los cortes teñidos con H&E/azul de Alcian, se pudo confirmar que el soporte estructural de los arcos branquiales en esta etapa del desarrollo (alevines a partir de una semana post-eclosión), corresponde a cartílago hialino pero, a diferencia de las muestras diafanizadas, en los cortes histológicos sí se pudieron observar filamentos branquiales que se proyectaban a partir de cada arco, aunque poco desarrollados, así como también la aparición de algunos esbozos de laminillas (Figura 7).

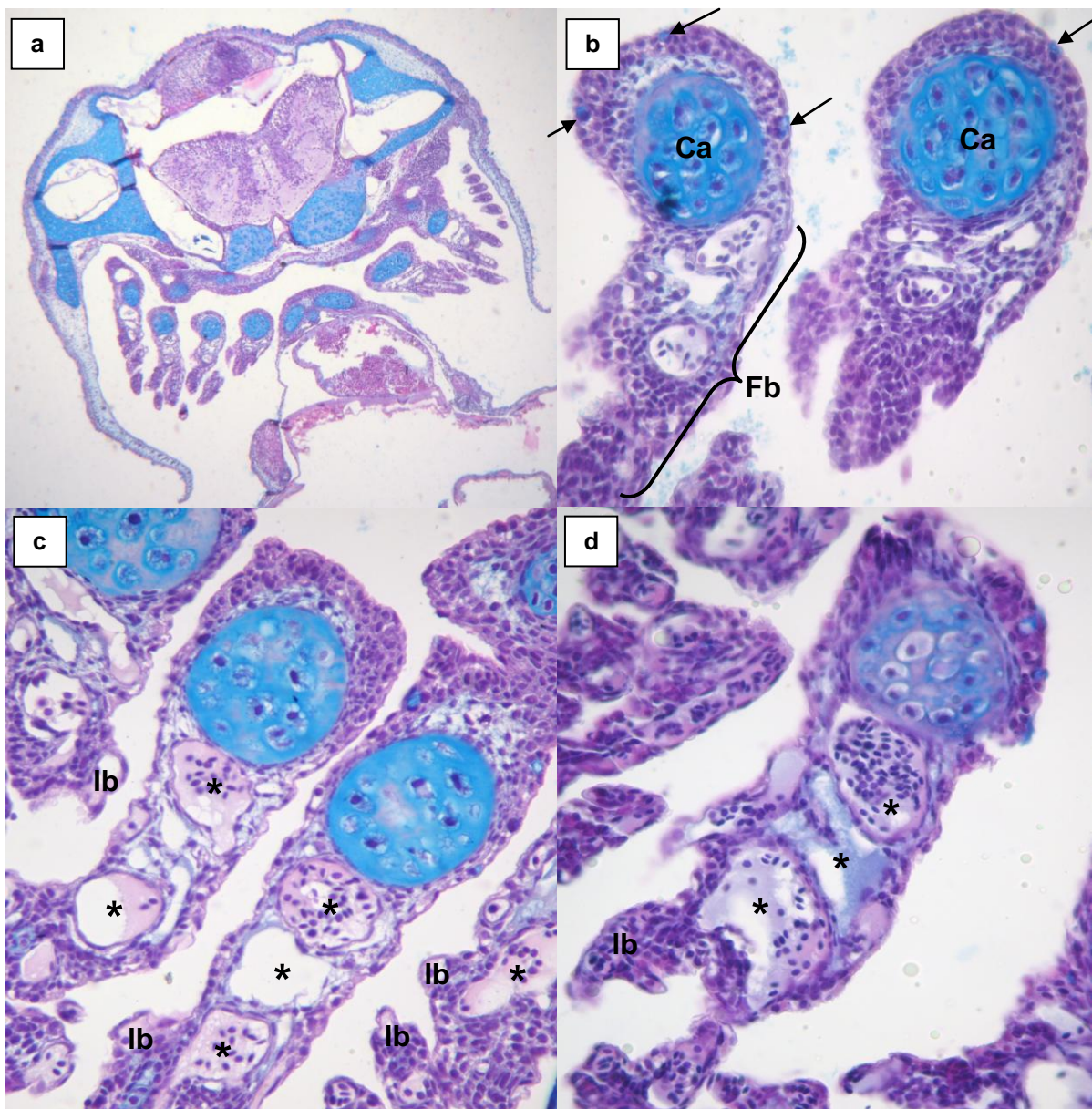


Figura 7: Cortes transversales de las branquias de alevines *S. salar*, día 3 del estudio. a) Individuo grupo C, vista general, 5x; b) Individuo grupo C, Ca: cartilago hialino, Fb: filamento branquial, las flechas indican células mucosas en el epitelio branquial, 40x; c) Individuo grupo T1, 40x; d) Individuo grupo T2, 40x. En c) y d) se observa el mayor diámetro de los vasos sanguíneos (*) respecto al individuo control y los esbozos de laminillas branquiales (lb). H&E/azul de Alcian.

El epitelio de revestimiento de los arcos branquiales presentó un aspecto muy celular e indiferenciado, con escasas células mucosas, las que mostraron una tendencia a aumentar con el transcurso de los días y con el grado de hipoxia. Estas células no se observaron en el epitelio que reviste los filamentos (Figura 7).

El núcleo de los filamentos branquiales se observó formado por tejido mesenquimático muy vascularizado. La superficie ocupada por los vasos se incrementó de forma notoria en los alevines provenientes de los grupos expuestos a hipoxia (Figuras 7c y 7d), en los que además fue posible observar la aparición de numerosos brotes vasculares, principalmente en el extremo distal de los filamentos.

La ausencia de calcificación de los cartílagos branquiales y del esqueleto en general, observada con la técnica de diafanización, fue consistente con el resultado (-) a depósitos de calcio en los cortes histológicos teñidos con von Kossa, en todos los ejemplares (normóxicos e hipóxicos) y días analizados (Figura 8).

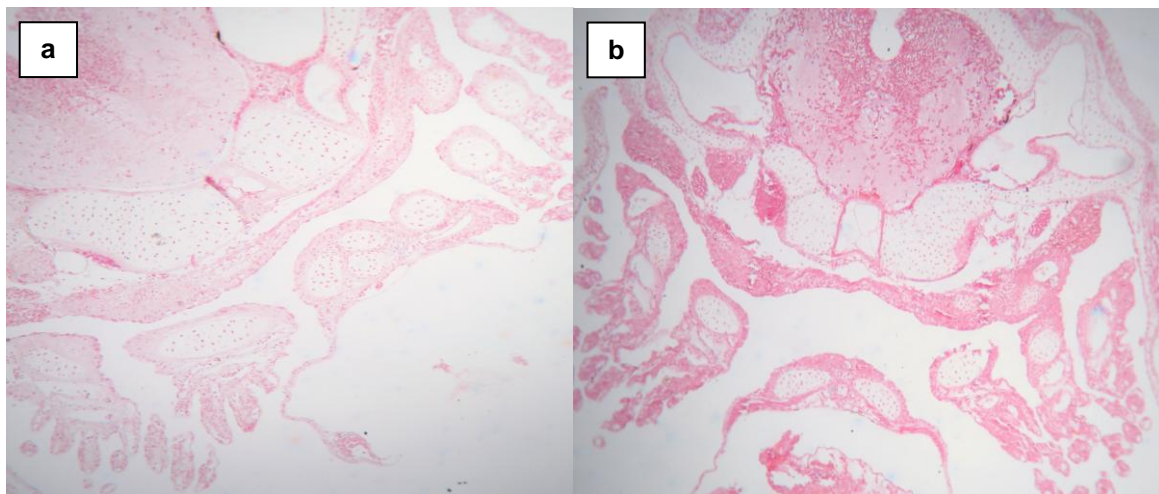


Figura 8: Cortes transversales de los arcos branquiales de alevines *S. salar*, día 5 del estudio. a) Individuo control; b) Individuo grupo T2. No se observan depósitos de calcio en los cartílagos branquiales, los que se habrían visualizado de color negro. Técnica de von Kossa, 10x.

Por otra parte, en los individuos del grupo control, los tejidos branquiales resultaron (-) a la inmunomarcación para HIF-1 α durante todo el periodo experimental (Figuras 9a y 9b); en cambio, en los alevines provenientes de los grupos T1 y T2, las células del epitelio branquial sí presentaron marcaje (+) (Figura 9c). En estos ejemplares, también se observaron células con inmunomarcación (+) para HIF-1 α en la epidermis (Figura 9d) y el endotelio vascular.

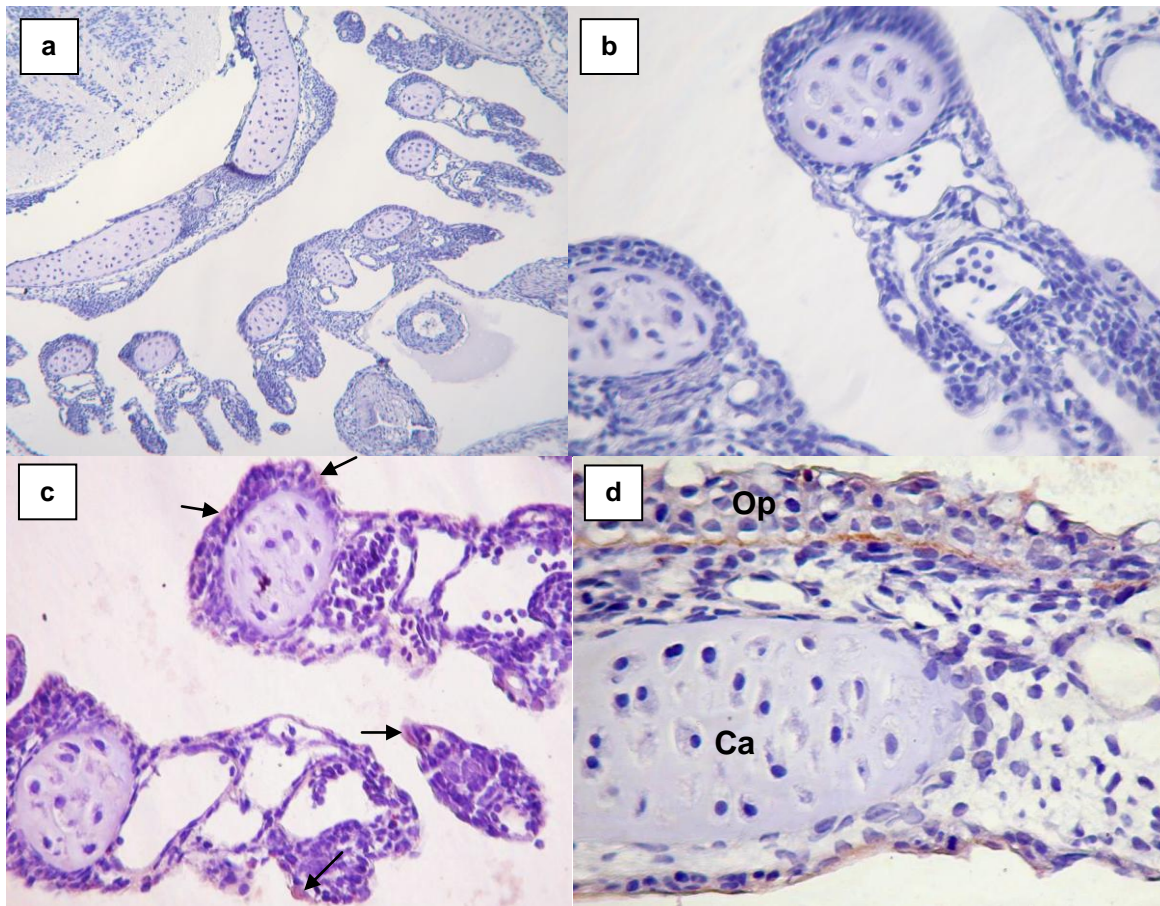


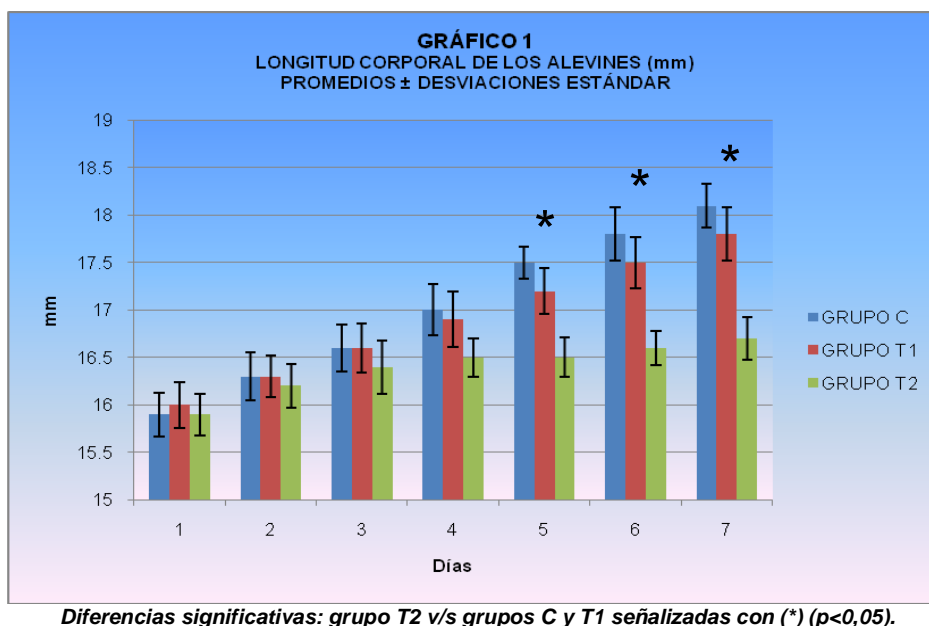
Figura 9: Cortes transversales de branquias tratadas con técnica inmunohistoquímica anti-HIF-1 α , día 6 del estudio. a) Individuo grupo C, vista general, 10x; b) Individuo grupo C, las células del epitelio branquial y los condrocitos son (-) para HIF-1 α , 40x; c) Individuo grupo T1, células (+) para HIF-1 α en el epitelio branquial se observan de color café (flechas), 40x; d) Individuo grupo T1, se observan células con inmunomarcación (+) en el epitelio que reviste el opérculo (Op), mientras que en el cartilago (Ca) los condrocitos son (-), 40x.

7.3 REGISTROS MORFOMÉTRICOS MACROSCÓPICOS.

7.3.1 Longitud corporal.

Como muestran la tabla 1 (anexo 4) y el gráfico 1, al comparar la longitud corporal promedio de los alevines pertenecientes a los grupos T1 y T2, con la de los respectivos individuos del grupo control (grupo C, en normoxia), esta variable presentó menores valores promedio diarios en ambos grupos expuestos a hipoxia. Sin embargo, en el caso del grupo T1, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo C, para ninguno de los días del

estudio, a diferencia del grupo T2, en que estas diferencias alcanzaron significancia estadística ($p < 0,05$) a partir de los 5 días de exposición a hipoxia.



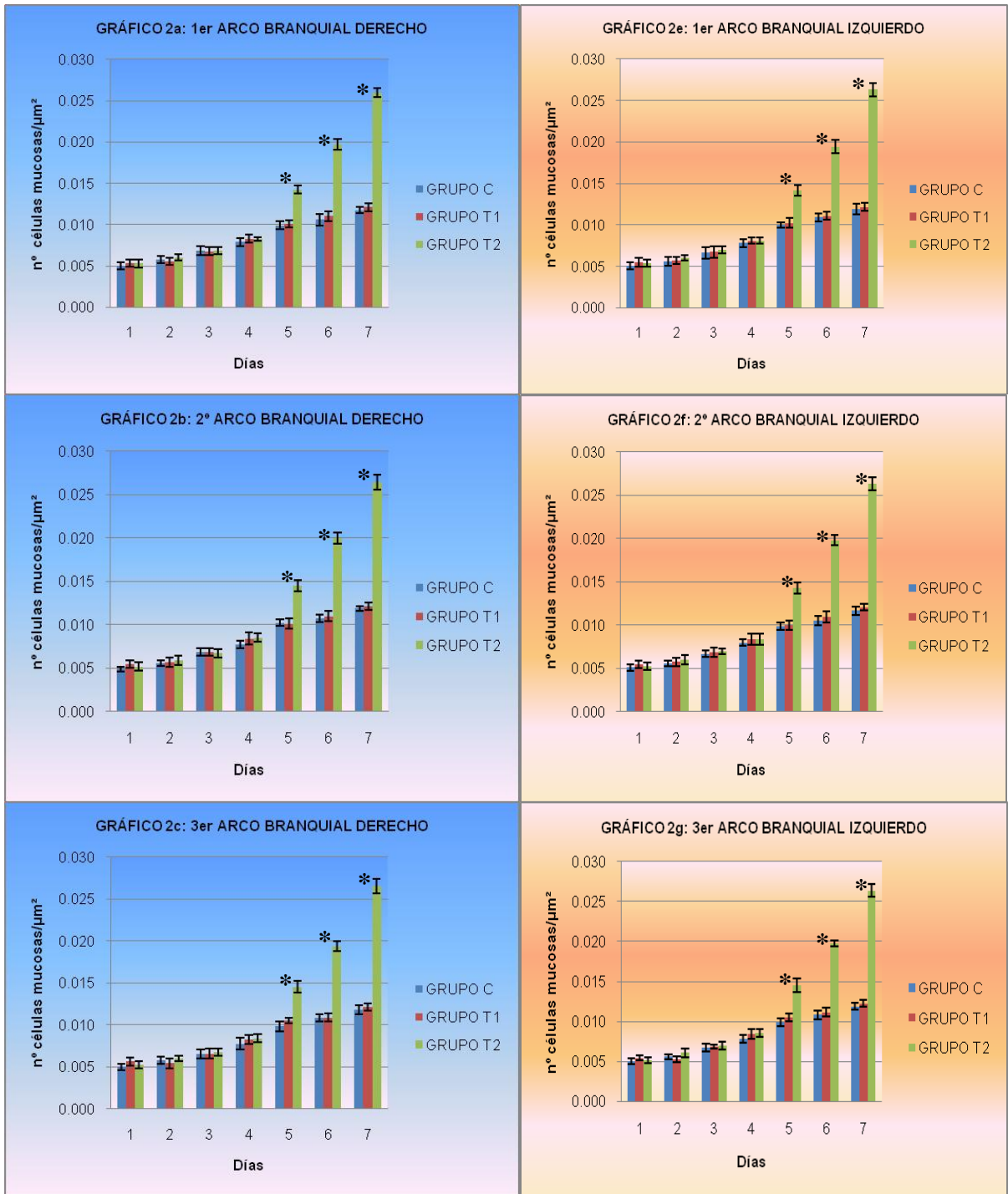
7.4 REGISTROS MORFOMÉTRICOS MICROSCÓPICOS.

7.4.1. Densidad de células mucosas en el epitelio branquial.

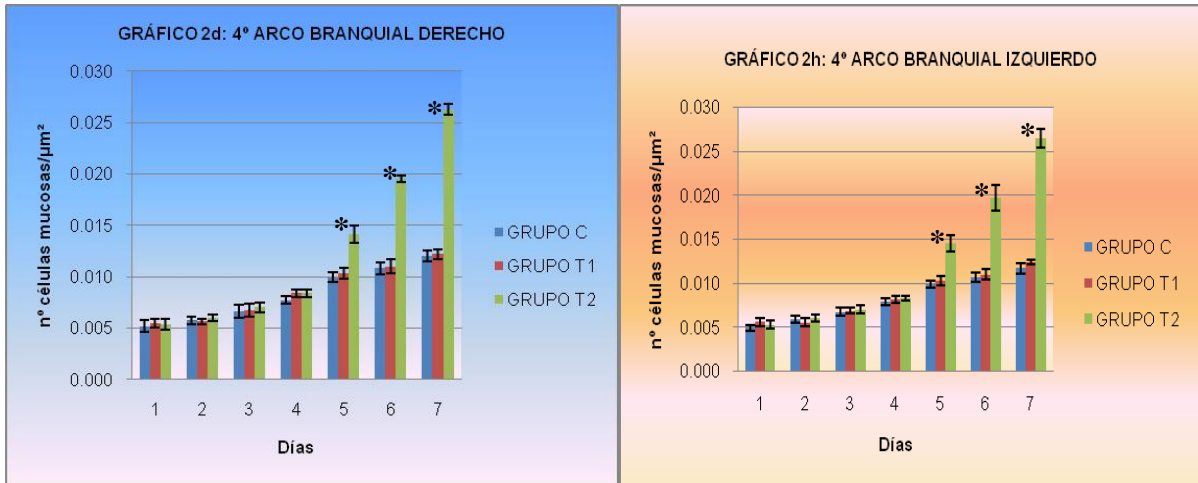
En la tabla 2 (anexo 4) y el gráfico 2 se puede observar que la densidad promedio de las células mucosas en el epitelio branquial, fue similar al comparar los arcos derechos con los arcos izquierdos, en todos los grupos y días evaluados.

Por otra parte, esta variable mostró una tendencia a aumentar en el tiempo, tanto en el grupo control como en los dos grupos expuestos a hipoxia. Sin embargo, no hubo diferencias entre el grupo C y el grupo T1, para ninguno de los días que comprendió este estudio, mientras que, a partir del día 5 de tratamiento, la densidad de este tipo celular en el epitelio branquial, fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en el grupo T2, respecto a los grupos control y T1.

GRÁFICO 2
DENSIDAD DE CÉLULAS MUCOSAS (nº cel/µm²) EN EL EPITELIO
DE LOS ARCOS BRANQUIALES DERECHOS (2a, 2b, 2c, 2d) E IZQUIERDOS (2e, 2f, 2g, 2h).
PROMEDIOS ± DESVIACIONES ESTÁNDAR



Diferencias significativas: grupo T2 v/s grupo C y T1 señalizadas con () (p<0,05).*

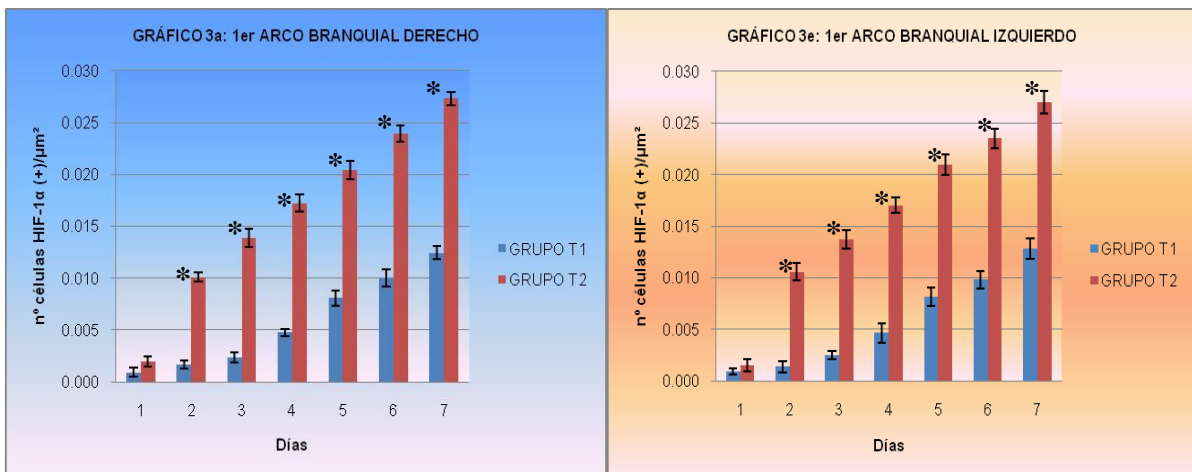


Diferencias significativas: grupo T2 v/s grupo C y T1 señalizadas con (*) ($p < 0,05$).

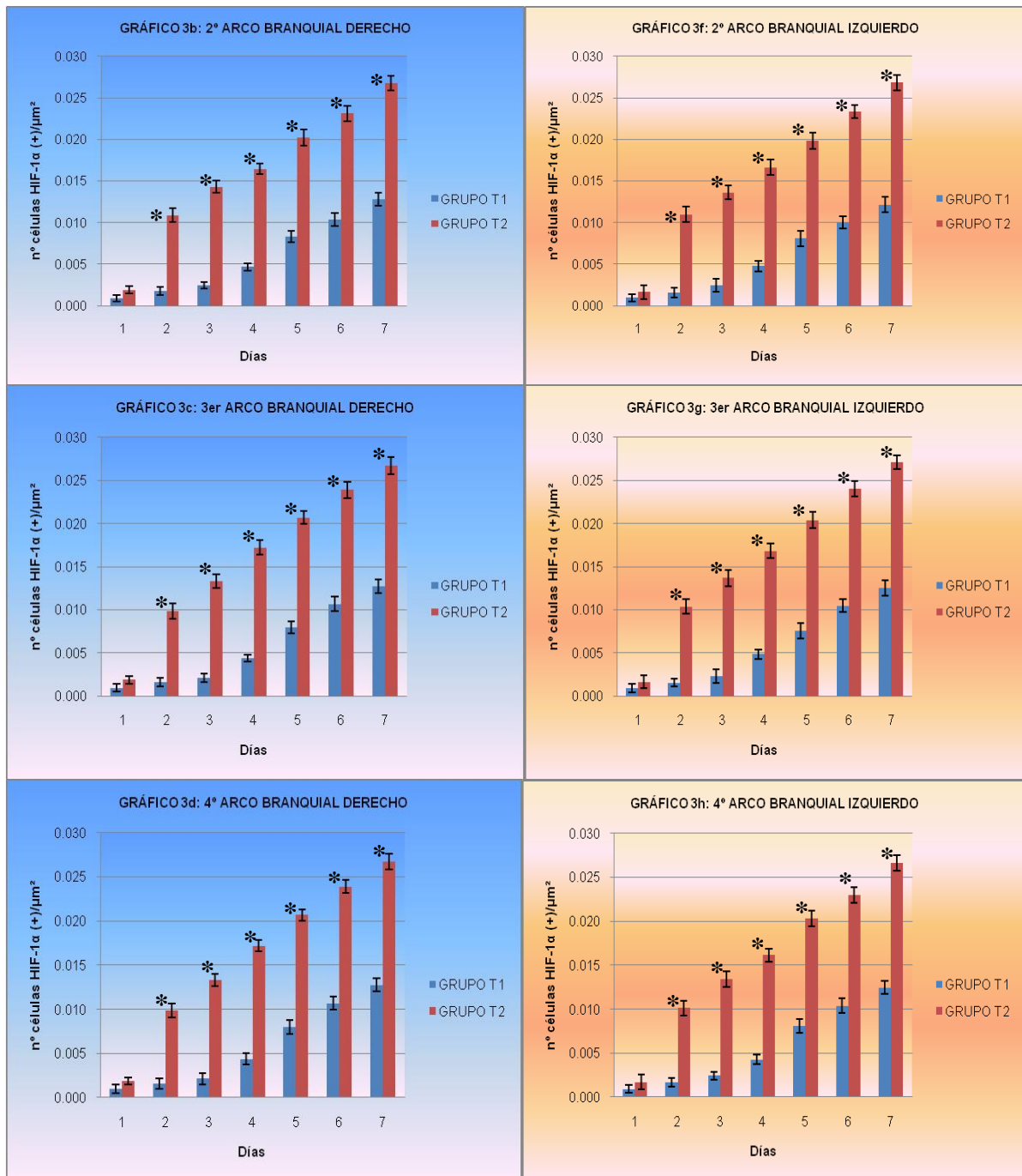
7.4.2. Densidad de células con inmunomarcación (+) para HIF-1 α .

Como ya se mencionó, en los individuos del grupo control las células del epitelio branquial resultaron (-) a la inmunomarcación contra HIF-1 α durante todo el periodo experimental, a diferencia de los alevines provenientes de los grupos T1 y T2, cuyo epitelio sí presentó marcaje (+) para este factor.

GRÁFICO 3
DENSIDAD DE CÉLULAS EPITELIALES CON INMUNOMARCACIÓN (+) PARA HIF-1 α (nº cel/ μ m²) EN LOS ARCOS BRANQUIALES DERECHOS (3a, 3b, 3c, 3d) E IZQUIERDOS (3e, 3f, 3g, 3h). PROMEDIOS \pm DESVIACIONES ESTÁNDAR



Diferencias significativas entre grupos señalizadas con (*) ($p < 0,05$).



Diferencias significativas entre grupos señaladas con () ($p < 0,05$).*

Como se aprecia en la tabla 3 (anexo 4) y el gráfico 3, para cada día del estudio, el comportamiento de esta variable fue similar en los arcos del lado derecho al compararlos con los respectivos arcos izquierdos. También se puede observar, que la densidad promedio de células (+) para HIF-1 α aumentó progresivamente en el

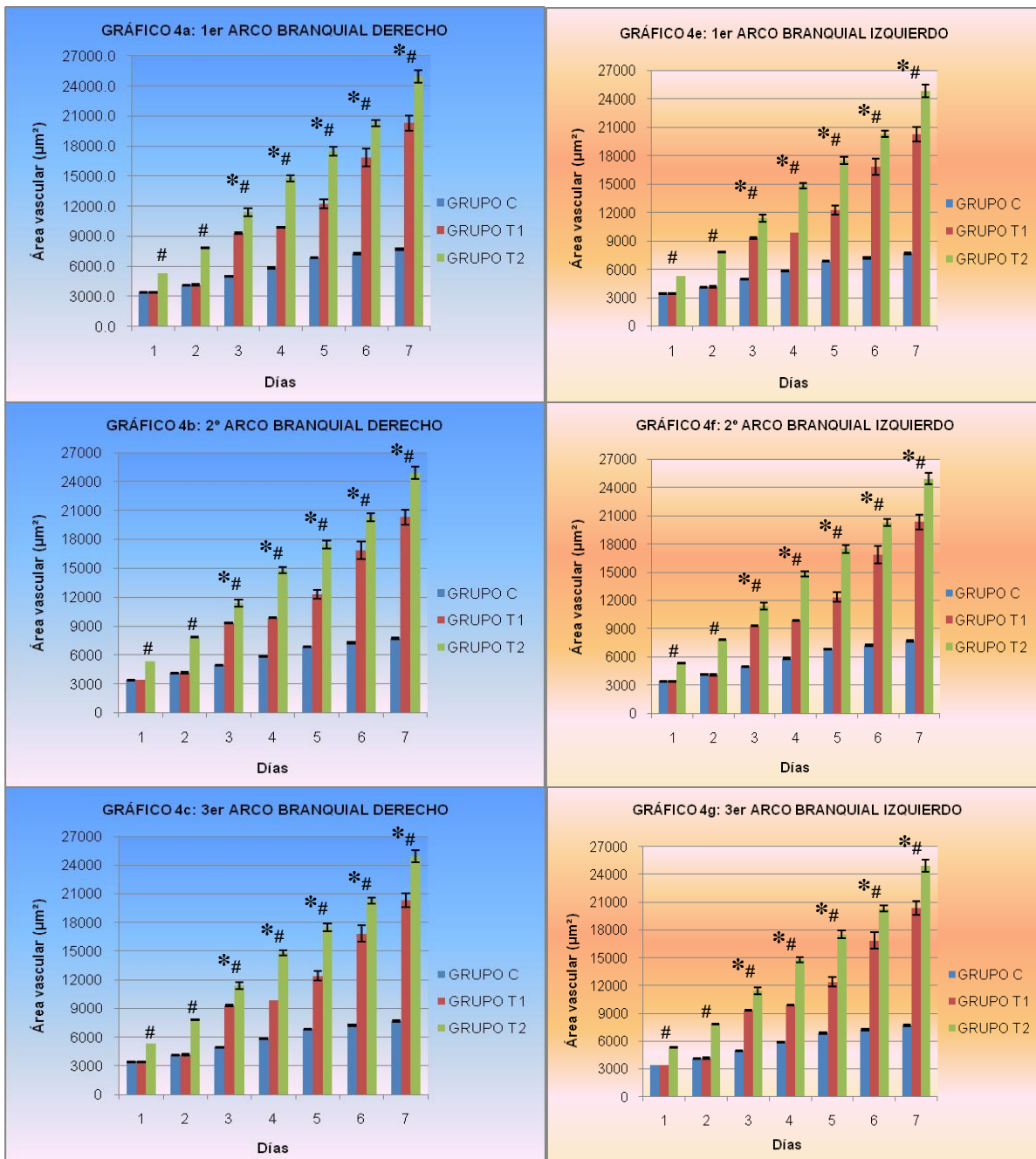
tiempo y con la intensidad del estímulo hipóxico. De hecho, el número de células inmunomarcadas para HIF-1 α por μm^2 , fue significativamente mayor en el grupo T2, respecto al grupo T1, a partir del día 2 de exposición a hipoxia, en todos los arcos branquiales ($p < 0,05$).

7.4.3. Área vascular branquial.

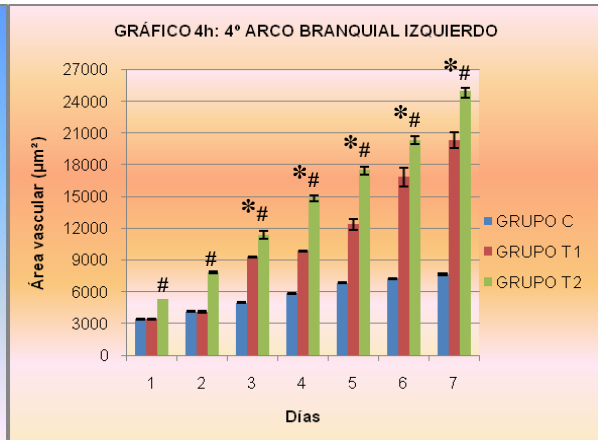
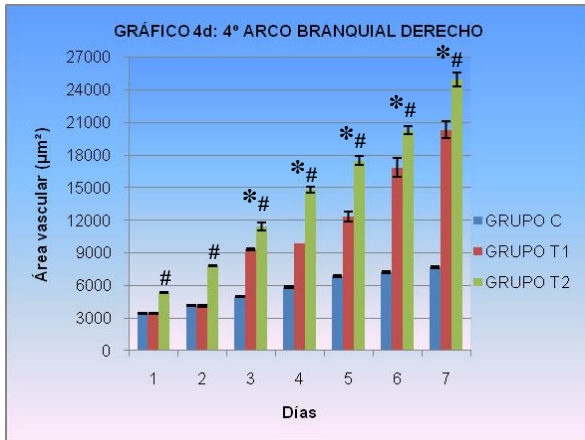
Al igual como se observó con las variables anteriores, no se encontraron diferencias al comparar los arcos branquiales derechos con los correspondientes arcos izquierdos, tabla 4 (anexo 4) y gráfico 4.

Del mismo modo, se observó que el área vascular promedio fue aumentando en el tiempo, tanto en el grupo C como en los grupos T1 y T2, sin embargo, este aumento fue significativamente mayor en los dos grupos sometidos a hipoxia. En el caso del grupo T1, el aumento del área vascular promedio respecto al grupo C, fue significativo ($p < 0,05$) a partir del día 3 de exposición a hipoxia, mientras que en el grupo T2, hubo significancia estadística a partir del día 1 del periodo de estudio ($p < 0,05$), tanto al comparar este aumento con el grupo C como con el grupo T1, en todos los arcos branquiales. Es importante destacar que, en los grupos T1 y T2, se encontró una correlación alta ($r = 0,89$) y significativa ($p < 0,000$) entre la inmunomarcación (+) para HIF-1 α y el área vascular branquial, durante todo el periodo que comprendió este trabajo (tabla 5, anexo 4).

GRÁFICO 4
ÁREA VASCULAR (μm^2) EN LOS ARCOS BRANQUIALES DERECHOS (4a, 4b, 4c, 4d)
E IZQUIERDOS (4e, 4f, 4g, 4h).
PROMEDIOS \pm DESVIACIONES ESTÁNDAR



Diferencias significativas: grupo C v/s grupo T1 señalizadas con (*); grupo C v/s grupo T2 señalizadas con (#) ($p < 0,05$).



Diferencias significativas: grupo C v/s grupo T1 señalizadas con (*); grupo C v/s grupo T2 señalizadas con (#) ($p < 0,05$).

8. DISCUSIÓN

El periodo durante el cual los alevines de los grupos T1 y T2 estuvieron expuestos a hipoxia (entre 1 y 7 días), permitió evaluar los cambios que a nivel branquial pueden observarse tras la exposición crónica a una menor saturación de oxígeno del agua, considerándose hipoxia leve un 75% SatO₂ del agua e hipoxia moderada un 60% SatO₂ del agua. Estos porcentajes se determinaron considerando que, en las plantas salmoneras, es habitual la disposición de los alevines en contenedores con altas densidades poblacionales, manejo que los expone a frecuentes periodos de hipoxia. Este criterio concuerda con lo planteado por Miller y cols. (2008), para quienes una hipoxia moderada crónica es la condición en la cual los embriones son mantenidos en agua con un 50% SatO₂ por un periodo superior a 24 horas, situación a la que los embriones de salmónidos estarían expuestos frecuentemente, incluso en su ambiente natural.

Como parte de los resultados, se pudo observar un menor crecimiento en los alevines que permanecieron en un ambiente hipóxico, al compararlos con los individuos control (normoxia). Como todos los grupos se mantuvieron bajo condiciones similares de manejo y a una misma temperatura (10°C), la menor longitud corporal alcanzada el día 7 del estudio por los individuos de los grupos T1 y T2, puede ser atribuida a la menor disponibilidad de oxígeno en el agua. Esta respuesta estaría en directa relación con la intensidad y duración del estímulo hipóxico, ya que la longitud de los alevines sólo resultó significativamente menor a la del grupo control a partir del día 5 del periodo experimental en el grupo sometido a una hipoxia más intensa (60%SatO₂). Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Barrionuevo y cols. (2010), quienes mantuvieron individuos de la

especie *Danio rerio* a 28°C en condiciones de normoxia (7,5 mgO₂L⁻¹) y de hipoxia moderada (4,3 mgO₂L⁻¹), por un periodo que se extendió desde la etapa de embrión (<10 días post fertilización (dpf)) hasta los 100 dpf, observando un retraso en el crecimiento, expresado como peso corporal y longitud corporal, de los animales mantenidos bajo hipoxia al compararlos con los individuos del grupo control. De forma similar, Miller y cols. (2008), al comparar la tasa de crecimiento de embriones de trucha arco-iris en etapa de ova con ojo, mantenidos en condiciones de normoxia (100% SatO₂ a 10°C), hipoxia aguda (30 minutos con 50% SatO₂ a 10°C) e hipoxia crónica (24 hrs. con 50% SatO₂ a 10°C), observaron que si bien en los tres grupos el crecimiento en promedio aumenta en el tiempo, es en el grupo expuesto a hipoxia crónica donde este aumento es significativamente menor comparado con el grupo control. Así también, ovas embrionadas de la especie de agua dulce *Acanthopagrus butcheri* fueron expuestas a diferentes concentraciones de oxígeno disuelto y se observó su desarrollo hasta 2 días post eclosión. Aquellos embriones mantenidos en un ambiente considerado moderadamente hipóxico (55% SatO₂), eclosionaron precozmente y presentaron una longitud corporal reducida, mientras que en el grupo mantenido en un ambiente con menos de 55% SatO₂, no hubo supervivencia a los 2 días post eclosión (Hassell y cols., 2008).

En este trabajo, no se registraron mortalidades en ninguno de los grupos y días que duró el estudio, lo que indicaría que después de la eclosión, los alevines *S. salar* serían resistentes a ambientes leve y moderadamente hipóxicos, observación que sería apoyada por la ausencia de alteraciones morfológicas en estos ejemplares, por el hecho de que el crecimiento en los alevines del grupo T1 fue similar al del grupo control y, porque en el caso del grupo T2, la longitud corporal de los individuos sólo

se hizo significativamente menor a la del grupo normóxico a partir del día 5 de exposición a hipoxia, como se mencionó anteriormente. Resultados similares fueron obtenidos por Jacob y cols. (2002), quienes al comparar larvas de la especie *Danio rerio* mantenidas en hipoxia durante 6 días con individuos mantenidos en normoxia, no encontraron diferencias morfológicas entre ambos grupos, ni siquiera en la diferenciación branquial.

Respecto al desarrollo presentado por las branquias, no se encontraron diferencias entre los alevines del grupo control y aquellos mantenidos en un ambiente hipóxico. Macroscópicamente, no fue posible observar filamentos ni laminillas branquiales, pero sí los cuatro pares de arcos branquiales, de estructura cartilaginosa. Sin embargo, histológicamente sí se pudieron observar filamentos poco desarrollados, así como la diferenciación de escasos esbozos de laminillas, descripción que concuerda con la realizada por Wells y Pinder (1996_a) para esta especie. En su trabajo, y mediante el uso de microscopía electrónica, éstos describen cuatro pares de arcos branquiales, con un promedio de 30-80 filamentos en cada hemibranchia, pero con escaso o ausente desarrollo de laminillas. Los filamentos, al momento de la eclosión tenían una longitud promedio de 0,16 mm, mientras que al momento de la absorción del saco vitelino, la longitud promedio fue de 0,7 mm. De forma similar, González y cols. (1995) observaron que, en alevines de trucha arco iris de 15 mm de longitud, sólo existen esbozos de los filamentos branquiales, mientras que la diferenciación de las laminillas no ocurre sino hasta que los alevines llegan a la etapa juvenil, en la que miden en promedio 23 mm.

Por lo tanto, el escaso desarrollo presentado por las branquias de los alevines analizados, demostraría que en esta etapa del ciclo de vida de la especie *S. salar*,

éstas aún no constituyen el sitio primario para el intercambio de gases, coincidiendo con lo planteado por Wells y Pinder (1996_b) para esta misma especie. Estos autores determinaron que, al momento de la eclosión, el 92% de la captación de oxígeno se realiza a través de la piel y sólo el 8% ocurre a través de las branquias, mientras que en la etapa en la cual finaliza la absorción del saco vitelino, el 32% de la captación de oxígeno es cutánea y el 68% es branquial. Una situación similar describen Rombough y Ure (1991) en alevines de salmón Chinook, etapa en la que presentan branquias poco desarrolladas que realizan sólo el 50% de la captación de oxígeno.

Los ejemplares utilizados en este trabajo se encontraban en la etapa de “alevín de saco”, permaneciendo inactivos en el fondo de los contenedores, tal como lo describen Estay y cols. (1994) para trucha arco iris; por lo que el poco desarrollo de las branquias podría deberse además a que, como éstas son el principal sitio de intercambio de agua y iones, una superficie branquial mayor durante esta etapa implicaría un gran gasto energético para mantener la actividad de las bombas iónicas. Según Nilsson (2007), el costo energético de la ionorregulación y de la osmorregulación para los peces varía entre un 10% y un 50% del presupuesto energético del animal, por lo cual especies más inactivas tendrían una menor superficie branquial que aquellas más activas.

Por ejemplo, las carpas son reconocidas por su tolerancia a la hipoxia, condición bajo la cual las branquias despliegan laminillas prominentes, mientras que bajo condiciones de normoxia presentan una superficie branquial reducida, ya que las laminillas si bien están presentes, son escasas y el espacio entre ellas se encuentra ocupado por una masa celular interlaminillar, lo que sería un mecanismo para reducir el influjo de agua y la pérdida de iones a través de las branquias, pero

proporcionando suficiente superficie para el intercambio de gases (Sollid y cols., 2003; Matey y cols., 2008). De hecho, después de 8 a 24 horas de exposición a hipoxia, en las branquias de la carpa *Gymnocypris przewalskii*, se observa la elongación gradual de las laminillas respiratorias y la reducción de la distancia de difusión agua-sangre. Sin embargo, estos cambios que facilitarían la captación de oxígeno durante la hipoxia, estuvieron asociados con una reducción en los niveles plasmáticos de Na^+ y Cl^- , indicando que los ajustes para asegurar la captación de oxígeno, tienen un efecto negativo en la regulación iónica del pez (Matey y cols., 2008).

En los cortes teñidos con H&E/azul de Alcian pH 2,5, fue posible observar numerosas células mucosas en la epidermis de todos los individuos analizados en este estudio, tal como lo describen Wells y Pinder (1996_b) para esta misma especie. Estas células también fueron observables, aunque en menor cantidad, en el epitelio que reviste los arcos branquiales, no así en el epitelio de los filamentos.

Esta diferente distribución de las células productoras de mucus a lo largo del epitelio branquial de alevines *S. salar*, también se ha descrito en otras especies de peces. En *Poecilia vivipara* (Rocha y cols., 2010), se ubican sólo en los arcos branquiales y en la región apical de los filamentos; en *Micropogonias furnieri* (Díaz y cols., 2001) y en la pescadilla de red, *Cynoscion guatucupa* (Díaz y cols., 2005), las células mucosas se ubican en el epitelio que reviste las laminillas primarias y secundarias; en el róbalo (*Dicentrarchus labrax*), se distribuyen en el epitelio de los filamentos (Diler y Cinar, 2009); mientras que en *Cyprinus carpio*, se encuentran ampliamente distribuidas en las branquias, siendo más numerosas en los arcos branquiales (Cinar y cols., 2008).

Al igual que en este trabajo, en las especies mencionadas las células mucosas presentaron una fuerte reacción positiva con azul de Alcian pH 2,5, lo que demuestra su contenido de glicoconjugados ácidos. Las glicoproteínas ácidas y sulfatadas impiden la proliferación de microorganismos potencialmente patógenos en la superficie epitelial (Morón y cols., 2009), pues forman un gel altamente hidrofílico que incrementa su volumen debido a una rápida hidratación, proporcionando una barrera física contra agentes irritantes, evitando la penetración de microorganismos (Rocha y cols., 2010). Además, debido a su acidez, el mucus podría incrementar la concentración local de iones en la superficie branquial, facilitando su intercambio y limitando el influjo de agua (Matey y cols., 2008).

Respecto a la densidad de células mucosas en el epitelio de los arcos branquiales, no se registraron diferencias significativas al comparar los grupos control y T1; en ambos, ésta fue baja, con una tendencia a aumentar en el tiempo, mientras que en el grupo T2, si bien estas células muestran un comportamiento similar, su densidad fue significativamente mayor respecto al grupo control a partir del día 5 de exposición a hipoxia. Estos resultados, demostrarían que existe una respuesta por parte de este tipo celular a la hipoxia, respuesta que está relacionada directamente con la intensidad y duración de la misma. De forma similar, Matey y cols. (2008) describen en *G. przewalskii*, sobreproducción y depósito de mucus en la superficie de los filamentos branquiales de peces expuestos a hipoxia, mientras que en condiciones de normoxia, sólo se observan escasas células mucosas en el epitelio de los filamentos.

En este sentido, Cinar y cols. (2008) y Morón y cols. (2009), plantean que las células productoras de mucus son numérica y morfológicamente afectadas por

condiciones ambientales estresantes para los peces, observándose un aumento de ellas en enfermedad bacteriana de las branquias, alta concentración de amonio, salinidad, acidez, desecación y bajas temperaturas. Es así, como Roberts y Powell (2005) observaron que el número de células mucosas branquiales y la viscosidad del mucus secretado, eran significativamente mayores en ejemplares de las especies salmón del Atlántico (*Salmo salar*), trucha café (*Salmo trutta* L.) y trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) mantenidos en agua de mar, respecto de aquellos mantenidos en agua dulce. En *S. salar* y *S. trutta*, este aumento comprometió el cuerpo completo, mientras que *O. mykiss* exhibió sólo una respuesta branquial local.

De acuerdo a lo planteado en el punto anterior, es que la baja densidad de células mucosas en el epitelio de los arcos branquiales en los alevines pertenecientes al grupo T1 (75% SatO₂), estaría indicando que esta especie es poco susceptible a ambientes levemente hipóxicos, como también lo demostraría el comportamiento de la variable longitud corporal en este mismo grupo. Cabe destacar que para las dos variables mencionadas, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos C y T1, para ninguno de los días que comprendió el estudio.

Por lo tanto, la descarga de mucus por estas células sería parte de la respuesta de los peces al estrés (Matey y cols., 2008), sumándose a la participación de este tipo celular en procesos como osmorregulación, difusión de iones, protección contra la deshidratación y defensa contra microorganismos patógenos, parásitos y contaminantes (Díaz y cols., 2001; Calabró y cols., 2005; Díaz y cols., 2005; Cinar y cols., 2008; Diler y Cinar, 2009).

Respecto al comportamiento de la variable área vascular, observamos que ésta fue aumentando con el transcurso de los días, tanto en el grupo control como en los grupos T1 y T2. En el grupo control, este aumento tendría relación con el inicio de los cambios morfológicos que, más avanzado el desarrollo, van a llevar a las branquias a convertirse en el sitio primario del intercambio de gases, pues no podrían actuar como “órganos respiratorios” si no son capaces de realizar el transporte circulatorio de oxígeno a los tejidos. Así también lo plantean Wells y Pinder (1996_b), quienes al observar el desarrollo branquial del salmón del Atlántico, determinaron que si bien estas estructuras están poco desarrolladas al momento de la eclosión, su superficie y participación en la captación de oxígeno aumentan rápidamente, lo que va acompañado de un incremento en la perfusión branquial.

En el caso de los grupos expuestos a hipoxia, el aumento del área vascular branquial fue significativamente mayor al observado en los individuos del grupo control, y nuevamente esta respuesta fue mayor en los ejemplares pertenecientes al grupo que se mantuvo en un ambiente más hipóxico. En estos grupos, los altos valores obtenidos para esta variable se explican porque por un lado pudimos observar un aumento en el diámetro de los vasos sanguíneos branquiales, y por otro, se observó la aparición de numerosos brotes vasculares, principalmente en el extremo distal de los filamentos. Esta mayor perfusión de las branquias en condiciones de hipoxia podría tener relación con una mayor tasa metabólica de los tejidos branquiales, al encontrarse en un proceso de diferenciación y organización y, también, con el pronto comienzo del desarrollo de las laminillas branquiales, de modo que el flujo sanguíneo es redirigido hacia un sitio potencial para el intercambio de gases. Una respuesta similar se describe en *Danio rerio*, en el sentido que, entre

los 7 y 12 dpf, la hipoxia induce un significativo aumento de la perfusión del tejido muscular, posiblemente como un mecanismo para aumentar la captación de oxígeno a través de la superficie corporal. Así también, en larvas de anfibios la hipoxia acuática es capaz de estimular el crecimiento de la superficie respiratoria y acelerar la transición de la respiración branquial a respiración pulmonar, induciendo de esta forma, cambios en la diferenciación de estos órganos (Schwerte y cols., 2003).

El mayor diámetro vascular en las branquias de alevines sometidos a hipoxia también ha sido descrito por Nilsson (2007), como un mecanismo para aumentar la superficie respiratoria a través de una mayor perfusión sanguínea de filamentos y laminillas, mediante la vasodilatación de los vasos branquiales aferentes.

Como ya se mencionó, junto con el mayor diámetro de los vasos, se observó la aparición de pequeños brotes vasculares en las branquias de los alevines provenientes de los dos grupos mantenidos en hipoxia. Estos pequeños vasos podrían ser el resultado del gatillamiento del proceso de angiogénesis por parte del estímulo hipóxico, lo que estaría apoyado por el hecho de que se encontró una correlación alta y significativa entre las variables área vascular e inmunomarcación para HIF-1 α , y el aumento en sus valores tuvo relación directa con la duración e intensidad de la hipoxia. Por lo tanto, como HIF media la expresión de los genes que transcriben para el factor de crecimiento endotelial-vascular (VEGF) (Nikinmaa y Rees, 2005; Zarembek y Malech, 2005; Nanka y cols., 2006), podemos plantear que este factor sería el responsable del aumento observado en la vascularización local. Además, ya se ha demostrado que en peces la angiogénesis es estimulada por VEGF (Schwerte y cols., 2003).

Según Griffioen y Molema (2000) y Distler y cols. (2003), la hipoxia es el principal estímulo para la formación de nuevos vasos sanguíneos, al inducir, por parte de las células endoteliales, tumorales, inflamatorias y macrófagos, la producción de factores pro-angiogénicos, como el VEGF, los cuales a su vez generan efectos como aumento de la permeabilidad vascular y vasodilatación. Este último, sería un segundo mecanismo involucrado que permitiría explicar el aumento en el diámetro de los vasos branquiales en los dos grupos mantenidos en hipoxia.

Nuestros resultados concuerdan con Nanka y cols. (2006), quienes al estudiar la respuesta a la hipoxia en embriones de codorniz, encontraron una correlación temporal y espacial entre la intensidad del estímulo hipóxico y la expresión aumentada de HIF-1 α , 1 β y 2 α , de VEGF y del proceso de angiogénesis.

Es importante destacar lo temprano que, en los grupos expuestos a hipoxia, el área vascular alcanza valores significativamente más altos respecto al grupo control (día 3 para el grupo T1 y día 1 para el grupo T2), lo que podría indicar que el proceso de angiogénesis se habría iniciado con anterioridad al periodo experimental, como parte del desarrollo normal de las branquias de *S. salar*, tal como ocurre en *Danio rerio*, especie en la que en normoxia, ya a las 18 horas post fertilización se ha detectado una fuerte expresión de VEGF (Schwerte y cols., 2003).

De forma similar, en los grupos T1 y T2 ya al día 1 del periodo experimental, encontramos inmunomarcación (+) para HIF-1 α por parte del epitelio branquial. La rápida detección de este factor se podría explicar por la existencia de niveles basales del mismo, los que aumentarían a niveles detectables por el anticuerpo utilizado ante la menor disponibilidad de oxígeno. Se ha demostrado en embriones de ratón (Lee y cols., 2001) y de codorniz (Nanka y cols., 2006), que en condiciones

de normoxia, los órganos en desarrollo presentan una baja tensión de oxígeno, lo que sería un mecanismo fisiológico para estimular la angiogénesis. Incluso Nanka y cols. (2006), en embriones normóxicos de codorniz, detectaron actividad de HIF-1 α en miocardio, hígado y mesonefros, y reacción de HIF-1 β en tubo neural, vesículas auditivas y arcos branquiales.

En este estudio, a diferencia de los grupos expuestos a hipoxia, las branquias de los alevines del grupo control, siempre resultaron negativas para HIF-1 α , demostrando de esta forma, que es un buen indicador de la exposición a hipoxia por parte de estas estructuras.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que los alevines *S. salar* y, en especial los tejidos branquiales, son resistentes a ambientes leve y moderadamente hipóxicos, ya que las branquias sólo evidenciaron cambios más bien adaptativos a nivel histológico; además, los individuos mantenidos en hipoxia leve (75% SatO₂) no presentaron diferencias en su crecimiento respecto a los individuos mantenidos en normoxia, sumándose a esto la ausencia de mortalidades en el periodo que comprendió el estudio. Sin embargo, estas observaciones no debieran llevar a pensar que, en esta etapa del desarrollo, los peces pueden manejarse en condiciones de hacinamiento, ya que la respuesta a la hipoxia es plástica y difiere en los distintos tejidos. Es así como Castro y cols. (2011), al seguir el desarrollo de estos mismos individuos, encontraron que la exposición a hipoxia moderada (60% SatO₂) después de la eclosión, se correlacionaba con la presentación de distintas malformaciones a nivel de la columna vertebral al momento de iniciarse la vida libre (\pm 2 meses post eclosión).

Por lo tanto, evitar las altas densidades poblacionales en los contenedores y monitorear frecuentemente el nivel de oxigenación en los mismos, serían manejos imprescindibles para garantizar un desarrollo normal en esta especie.

9. CONCLUSIONES

1. Las branquias de *Salmo salar*, en la etapa de alevín de saco, están poco desarrolladas y no constituyen el sitio primario para el intercambio de gases.
2. Las branquias de alevines de la especie *S. salar*, son resistentes a la hipoxia leve y moderada, lo que se refleja en la ausencia de alteraciones morfológicas en estas estructuras tras la exposición a periodos de hipoxia.
3. Niveles de hipoxia leves y moderados inducen cambios histológicos en las branquias, principalmente a nivel vascular, los que serían parte de la respuesta adaptativa de esta especie a menores disponibilidades de oxígeno disuelto.
4. HIF-1 α sería un buen sensor de la exposición a hipoxia por parte de las branquias de *S. salar*, pues sólo fue detectable en los individuos expuestos a un medio hipóxico.

10. BIBLIOGRAFÍA

BARRIONUEVO, W.R.; FERNÁNDES, M.N.; ROCHA, O. 2010. Aerobic and anaerobic metabolism for the zebrafish, *Danio rerio*, reared under normoxic and hypoxic conditions and exposed to acute hypoxia during development. *Brazilian Journal of Biology*, 70: 425-434.

BETTEX-GALLAND, M.; HUGHES, G.M. 1973. Contractile filamentous material in the pillar cells of fish gills. *Journal of Cell Science*, 13: 359-370.

CALABRÓ, C.; ALBANESE, M.P.; LAURIANO, E.R.; MARTELLA, S.; LICATA, A. 2005. Morphological, histochemical and immunohistochemical study of the gill epithelium in the abyssal teleost fish *Coelorhynchus coelorhynchus*. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 43: 51-56.

CASTRO, R.; BUSTOS-OBREGÓN, E.; ROJAS, M. 2011. Hypoxia is like an ethiological factor in vertebral column deformity of salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 316: 13-19.

CINAR, K.; SENOL, N.; ÖZEN, M.R. 2008. Histochemical characterization of glycoproteins in the gills of the carp (*Cyprinus carpio*). *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 55: 61-64.

CIUHANDU, C.; WRIGHT, P.; GOLDBERG, J.; STEVENS, E. 2007. Parameters influencing the dissolved oxygen in the boundary layer of rainbow trout

(*Oncorhynchus mykiss*) embryos and larvae. The Journal of Experimental Biology, 210: 1435-1445.

CRESPO, S.; PADROS, F.; SALA, R.; MARLASCA, M.J. 1988. Gill structure of cultured *Salmo trutta fario* related to sampling techniques. Diseases of Aquatic Organisms, 4: 219-221.

DÍAZ, A.O.; GARCÍA, A.M.; DEVINCENTI, C.V.; GOLDEMBERG, A.L. 2001. Mucous cells in *Micropogonias furnieri* gills: Histochemistry and ultrastructure. Anatomía, Histología, Embryología, 30: 135-139.

DÍAZ, A.O.; GARCÍA, A.M.; GOLDEMBERG, A.L. 2005. Glycoconjugates in the branchial mucous cells of *Cynoscion guatucupa* (Cuvier, 1830) (Pisces: Sciaenidae). Scientia Marina, 69: 545-553.

DILER, D.; CINAR, K. 2009. A Histochemical Study of Glycoconjugates in the Gills of the Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L. 1758). G.U. Journal of Science, 22: 257-261.

DISTLER, J.W.; HIRTH, A.; KUROWASKA-STOLARSKA, M.; GAY, R.E.; GAY, S.; DISTLER, O. 2003. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. Quarterly Journal of Nuclear Medicine, 47: 149-161.

ECKERT, R. 1992. Fisiología Animal, mecanismos y adaptaciones. 3ª Edición. Interamericana McGraw-Hill. Madrid, España. 683 pp.

ESTAY, F.; CERISOLA, H.; TÉLLEZ, V. 1994. Biología del desarrollo y reproducción artificial en la trucha arco iris. Descripción embriológica y procedimientos asociados para los estados de desarrollo más relevantes en el manejo de un *hatchery*. Conicyt-Fondef, Serie de Publicaciones para la Acuicultura, N°1. 28 pp.

EVANS, D.; PIERMARINI, P.; CHOE, K. 2005. The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological Reviews*, 85: 97-177.

FERNANDES, M.N.; PERNA-MARTINS, S.A. 2001. Epithelial gill cells in the armored catfish, *Hypostomus* CF, *plecostomus* (LORICARIIDAE). *Brazilian Journal of Biology*, 61: 69-78.

GJERDE, B.; PANTE, M.; BAEVERFJORD, G. 2005. Genetic variation for a vertebral deformity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 244: 77-87.

GONZÁLEZ, M.E.; BLÁNQUEZ, M.J.; ROJO, C.; PUERTA, A.J. 1995. Scanning-electron microscopy of the development of the head of rainbow-trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 24: 257-263.

GRIFFIOEN, A.; MOLEMA, G. 2000. Angiogenesis: Potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases and chronic inflammation. *Pharmacological Reviews*, 52: 237-268.

HANKEN, J.; WASSERSUG, R. 1981. The visible skeleton. A new double-stain technique reveals the native of the 'hard' tissues. *Functional Photography*, 16: 22–26.

HASSELL, K.; COUTIN, P.C.; NUGEGODA, D. 2008. Hypoxia impairs embryo development and survival in black bream (*Acanthopagrus butcheri*). *Marine Pollution Bulletin*, 57: 302-306.

HELFMAN, G.; COLLETTE, B.; FACEY, D. 1997. *The Diversity of Fishes*. 3a Edición. Blackwell Science Inc. USA. 528 pp.

HOCHACHKA, P.; LUTZ, P. 2001. Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comparative Biochemistry and Physiology part B*. 130:435-459.

HUYSEUNE, A.; HALL, B.; WITTEN, E. 2007. Establishment, maintenance and modifications of the lower jaw dentition of wild Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) throughout its life cycle. *Journal of Anatomy*, 211: 471-484.

JACOB, E.; DREXEL, M.; SCHWERTE, T.; PELSTER, B. 2002. Influence of hypoxia and of hypoxemia on the development of cardiac activity in zebrafish larvae. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative, and Comparative Physiology*, 283: R911-R917.

JONZ, M.; NURSE, C. 2006. Ontogenesis of oxygen chemoreception in aquatic vertebrates. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 154: 139-152.

KIERNAN, J.A. 2008. Cap. 13: Methods for inorganic ions. In: Histological and Histochemical Methods, theory and practice. 4° Edición. Scion Publishing Ltd. Oxfordshire, UK. 609 pp.

KINKELIN, P; MICHEL, C.; GHITTINO, P. 1991. Tratado de las Enfermedades de los Peces. Acribia. Madrid, España. 353 pp.

LAW, S.; WU, R.; NG, P.; YU, R. KONG, R. 2006. Cloning and expression analysis of two distinct HIF-alpha isoforms gcHIF 1 alpha and gcHIF 4 alpha from the hypoxia-tolerant grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. BMC Molecular Biology, 7: 15.

LEE, Y.M.; JEONG, C.H.; KOO, S.Y.; SON, M.J.; SONG, H.S.; BAE, S.K.; RALEIGH, J.A.; CHUNG, H.Y., YOO, M.A.; KIM, K.W. 2001. Determination of hypoxia region by hypoxia marker in developing mouse embryos in vivo: a possible signal for vessel development. Developmental Dynamics, 220: 175-186.

MATEY, V.; RICHARDS, J.G.; WANG, Y.; WOOD, C.M.; ROGERS, J.; DAVIES, R.; MURRAY, B.W.; CHEN, X.Q.; DU, J.; BRAUNER, C.J. 2008. The effect of hypoxia on gill morphology and ionoregulatory status in the Lake Qinghai scaleless carp, *Gymnocypris przewalskii*. The Journal of Experimental Biology, 211: 1063-1074.

MÉNDEZ, R. 1997. La acuicultura a tres lustros de su partida. Aquanoticias Internacional, 35: 21-33.

MILLER, S.C. ; REEB, S.E.; WRIGHT, P.A.; GILLIS, T.E. 2008. Oxygen concentration in the water boundary layer next to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos is influenced by hypoxia exposure time, metabolic rate, and water flow. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 65: 2170-2177.

MIR, I.H.; CHANNA, A. 2009. Gills of the Snow Trout, *Schizothorax curvifrons* Heckel: A SEM Study. Pakistan Journal of Biological Sciences, 12: 1511-1515.

MORÓN, S.E.; DE ANDRADE, C.A.; FERNANDES, M.N. 2009. Response of mucous cells of the gills of traíra (*Hoplias malabaricus*) and jeju (*Hoplerethrinus unitaeniatus*) (Teleostei: Erythrinidae) to hypo- and hyper-osmotic ion stress. Neotropical Ichthyology, 7: 491-498.

NANKA, O.; VALÁSEK, P.; DVORÁKOVÁ, M.; GRIM, M. 2006. Experimental hypoxia and embryonic angiogenesis. Developmental Dynamics, 235: 723-733.

NIKINMAA, M.; REES, B. 2005. Oxygen-dependent gene expression in fishes. American Journal of Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 288: R1079-R1090.

NILSSON, G. 2007. Gill remodeling in fish – a new fashion or an ancient secret?. The Journal of Experimental Biology, 210: 2403-2409.

PADILLA, P.; ROTH, M. 2001. Oxygen deprivation causes suspended animation in the zebrafish embryo. *Developmental Biology*, 98: 7331-7335.

PODRABSKY, J.; LOPEZ, J.; FAN, T.; HIGASHI, R.; SOMERO, G. 2007. Extreme anoxia tolerance in embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*: insights from a metabolomics analysis. *The Journal of Experimental Biology*, 210: 2253-2266.

ROBERTS, S.D.; POWELL, M.D. 2005. The viscosity and glycoprotein biochemistry of salmonid mucus varies with species, salinity and the presence of amoebic gill disease. *Journal Comparative Physiology B*, 175: 1-11.

ROCHA, T.L.; CARVALHO, R.; YAMADA, A.T.; SABÓIA-MORAIS, S.M.T. 2010. Morphologic analysis of developmental phases and gill ontogenesis in neotropical species *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) exposed to different salinities. *Zoología*, 27: 554-562.

ROJAS, D.; PEREZ-MUNIZAGA, D.; CENTANIN, L.; ANTONELLI, M.; WAPPNER, P.; ALLENDE, M.; REYES, A. 2007. Cloning of hif-1 α and hif-2 α and mRNA expression pattern during development in zebrafish. *Gene Expression Patterns*, 7:339-345.

ROMBOUGH, P.J. 1998. Partitioning of oxygen uptake between the gills and skin in fish larvae: a novel method for estimating cutaneous oxygen uptake. *The Journal of Experimental Biology*, 201: 1763-1769.

ROMBOUGH, P.J.; URE, D. 1991. Partitioning of oxygen uptake between cutaneous and branchial surfaces in larval and young juvenile Chinook Salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Physiological Zoology*, 64: 717-727.

RYTKÖNEN, K.; VUORI, K.; PRIMMER, C.; NIKINMAA, M. 2007. Comparison of hypoxia-inducible factor-1 alpha in hypoxia-sensitive and hypoxia-tolerant fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology, part D*, 2: 177-186.

SADLER, J.; PANKHURST, P.; KING, H. 2001. High prevalence of skeletal deformity and reduced gill surface area in triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 198: 369–386.

SALMÓN CHILE. 2008. Ficha estadística del salmón, ficha industria del salmón (Nº12/2008). Departamento de estudios Salmón Chile [en línea] <<http://www.salmonchile.cl/files/Ficha%20Salmón%20Diciembre%202008.pdf>>. [consulta: 20/03/2010].

SCHWERTE, T.; UBERBACHER, D.; PELSTER, B. 2003. Non-invasive imaging of blood cell concentration and blood distribution in zebrafish *Danio rerio* incubated in hypoxic conditions *in vivo*. *The Journal of Experimental Biology*, 206: 1299-1307.

SEMENZA, G. 2000. HIF-1: Mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *Journal of Applied Physiology*, 88:1474–1480.

- SFAKIANAKIS, D.; KOUMOUNDOUROS, G.; DIVANACH, P.; KENTOURI, M.** 2004. Osteological development of the vertebral column and of the fins in *Pagellus erythrinus* (L. 1758) temperature effect on the developmental plasticity and morpho-anatomical abnormalities. *Aquaculture*, 232: 407-424.
- SHANG, E.; WU, R.** 2004. Aquatic hypoxia is a teratogen and affects fish embryonic development. *Environmental Science and Technology*, 38: 4763-4767.
- SOLLID, J.; DE ANGELIS, P.; GUNDERSEN, K.; NILSSON, G.** 2003. Hypoxia induces adaptive and reversible gross morphological changes in crucian carp gills. *The Journal of Experimental Biology*, 206: 3667-3673.
- VENEGAS, F.; MONTIEL, E.; FORNO, P.; ROJAS, M.** 2003. Histology of the Jaw deformation in salmon of Southern Chile (*Salmo salar*). *International Journal of Morphology*, 21: 211-219.
- VUORI, K.; SOITAMO, A.; VUORINEN, P.; NIKINMAA, M.** 2004. Baltic salmon (*Salmo salar*) yola-sac fry mortality is associated with disturbance in the function of hypoxia-inducible transcription factor (HIF-1 α) and consecutive gene expression. *Aquatic Toxicology*, 68: 301-313.
- WELLS, P.; PINDER, A.W.** 1996_a. The respiratory development of Atlantic salmon. I. Morphometry of gills, yolk sac and body surface. *The Journal of Experimental Biology*, 199: 2725-2736.

WELLS, P.; PINDER, A.W. 1996_b. The respiratory development of Atlantic salmon. II. Partitioning of oxygen uptake among gills, yolk sac and body surfaces. The Journal of Experimental Biology, 199: 2737-2744.

ZAREMBER, K.; MALECH, H. 2005. HIF-1 α : A master regulator of innate host defenses?. The Journal of Clinical Investigation, 115: 1702-1704.

11. ANEXOS

ANEXO 1: Método de Hanken y Wassersug (1981).

1. Fijar los fetos en formalina al 10%.
2. Posteriormente, se debe remover la piel y hacer un lavado con agua destilada por algunas horas hasta un lapso de 2 días.
3. Retirar el exceso de agua y sumergir las muestras en una solución compuesta por 20 mg de azul de Alcían 8GX, 70 ml de etanol absoluto y 30 ml de ácido acético glacial. Mantener en esta solución por 12 a 48 horas o hasta que el cartílago se torne azul.
4. Retirar el exceso de solución y colocar la muestra en etanol absoluto por 1 a 3 días, cambiando el alcohol al menos una vez durante este período. Continuar con baños de alcohol etílico en concentraciones decrecientes (95°, 75°, 40° y 15°), finalizando con agua destilada durante 2 horas.
5. A continuación, se coloca la muestra en una solución acuosa saturada (30 ml de borato de sodio, 70 ml de agua destilada, 1 gramo de tripsina), la que debe ser cambiada cada 2 o 3 días, o con mayor frecuencia si se torna azulosa.
6. Sumergir el feto en una solución de KOH al 0.5% diluido en agua destilada o alcohol etílico al 70%. Luego se satura con rojo alizarina S por uno o más días, hasta que los huesos se tornen de color rojo fuerte. Posteriormente, trasladar la muestra a concentraciones seriadas de glicerina-KOH al 0.5%, hasta llegar al 100% de glicerina, permaneciendo al menos 24 horas en cada paso.
7. Agregar timol o fenol a la glicerina pura, para inhibir el desarrollo de hongos.

ANEXO 2: Protocolo para demostración Inmunohistoquímica de HIF-1 α .

1. Desparafinar hasta agua destilada.
2. Recuperación antigénica: con "Proteinase K enzyme". Una gota en dos ml de PBS, a temperatura ambiente y en agitador por 15 minutos.
3. Lavado con agua destilada: un enjuague rápido y tres lavados de 5 minutos cada uno.
4. Bloqueo de la peroxidasa endógena: cubrir los tejidos con agua oxigenada 10 volúmenes al 3% en agua destilada, durante 15 minutos en el agitador y a temperatura ambiente.
5. Lavado rápido con agua destilada y tres lavados de 5 minutos cada uno, el último lavado con PBS.
6. Bloqueo de las uniones inespecíficas: cubrir los tejidos con "Protein Block Serum Free" o con PBS más BSA al 1%, durante 10 minutos, en agitador a temperatura ambiente, sin lavar.
7. Incubación con anticuerpo primario anti-HIF-1 α en concentración 1:100 en PBS más BSA al 1%, durante toda la noche, a 4°C.
8. Lavado en PBS pH 7,2 a 7,4. Un lavado rápido y tres lavados de 5 minutos cada uno.
9. Incubar anticuerpo secundario biotinilado para HIF-1 α en concentración de 1:200 en PBS más BSA al 1%, durante 60 minutos a temperatura ambiente.
10. Lavado en PBS pH 7,2 a 7,4. Un lavado rápido y tres lavados de 5 minutos cada uno.
11. Incubación con conjugado de estreptavidina/peroxidasa, diluido 1:200 en PBS más BSA al 1%, durante 60 minutos a temperatura ambiente.

12. Incubar con solución/ sustrato cromógeno DAB: 1 gota por ml de buffer durante 3 minutos en oscuridad.
13. Lavado con agua destilada: un enjuague rápido y 2 lavados de 5 minutos cada uno.
14. Contratinción con hematoxilina.
15. Lavar en agua corriente.
16. Carbonato de litio por 3 minutos.
17. Lavado en agua corriente por 5 minutos.
18. Alcohol 96° lavado rápido.
19. Alcohol 100° lavado rápido.
20. Alcohol 100° lavado rápido.
21. Alcohol 100° lavado rápido.
22. Alcohol 100° por 5 minutos.
23. Xiloles, 5 minutos en cada uno.
24. Montaje.

ANEXO 3: Protocolo para demostración Inmunohistoquímica de fvW.

1. Seguir los pasos del nº1 al nº6 detallados en el anexo 2.
2. Incubación con anticuerpo primario anti-factor de von Willebrand (fvW) en concentración 0,5:1000 en PBS más BSA al 1%, durante toda la noche, a 4° C.
3. Lavado en PBS pH 7,2 a 7,4. Un lavado rápido y tres lavados de 5 minutos cada uno.
4. Incubar anticuerpo secundario biotinilado para fvW en concentración de 1:200 en PBS más BSA al 1%, durante 60 minutos a temperatura ambiente.
5. Seguir los pasos del nº10 al nº24 detallados en el anexo 2.

ANEXO 4: Tablas.

TABLA 1
LONGITUD CORPORAL DE LOS ALEVINES (mm)
PROMEDIOS ± DESVIACIONES ESTÁNDAR

	GRUPO C	GRUPO T1	GRUPO T2
DÍA 1	15.9 ± 0.23	16.0 ± 0.24	15.9 ± 0.22
DÍA 2	16.3 ± 0.25	16.3 ± 0.22	16.2 ± 0.23
DÍA 3	16.6 ± 0.25	16.6 ± 0.26	16.4 ± 0.28
DÍA 4	17.0 ± 0.27	16.9 ± 0.29	16.5 ± 0.20
DÍA 5	17.5 ± 0.17	17.2 ± 0.24	16.5 ± 0.21
DÍA 6	17.8 ± 0.28	17.5 ± 0.27	16.6 ± 0.18
DÍA 7	18.1 ± 0.23	17.8 ± 0.28	16.7 ± 0.22

TABLA 2
DENSIDAD DE CÉLULAS MUCOSAS EN EL EPITELIO BRANQUIAL (nº cel/µm²)
PROMEDIOS ± DESVIACIONES ESTÁNDAR

		ARCOS DERECHOS				ARCOS IZQUIERDOS			
		Arco I	Arco II	Arco III	Arco IV	Arco I	Arco II	Arco III	Arco IV
GRUPO C	DÍA 1	0.00501 ± 0.00044	0.00491 ± 0.00024	0.00501 ± 0.00039	0.00520 ± 0.00056	0.00510 ± 0.00041	0.00511 ± 0.00041	0.00501 ± 0.00038	0.00492 ± 0.00033
	DÍA 2	0.00576 ± 0.00044	0.00557 ± 0.00035	0.00581 ± 0.00039	0.00576 ± 0.00039	0.00562 ± 0.00049	0.00562 ± 0.00031	0.00557 ± 0.00027	0.00585 ± 0.00040
	DÍA 3	0.00684 ± 0.00055	0.00688 ± 0.00045	0.00655 ± 0.00049	0.00665 ± 0.00061	0.00665 ± 0.00069	0.00670 ± 0.00039	0.00670 ± 0.00045	0.00674 ± 0.00050
	DÍA 4	0.00792 ± 0.00048	0.00772 ± 0.00039	0.00777 ± 0.00067	0.00772 ± 0.00041	0.00782 ± 0.00050	0.00796 ± 0.00038	0.00783 ± 0.00044	0.00787 ± 0.00043
	DÍA 5	0.00993 ± 0.00053	0.01025 ± 0.00034	0.00983 ± 0.00059	0.00992 ± 0.00048	0.01002 ± 0.00033	0.00988 ± 0.00046	0.00988 ± 0.00047	0.00988 ± 0.00040
	DÍA 6	0.01063 ± 0.00070	0.01077 ± 0.00044	0.01086 ± 0.00043	0.01081 ± 0.00060	0.01091 ± 0.00045	0.01049 ± 0.00054	0.01082 ± 0.00055	0.01067 ± 0.00048
	DÍA 7	0.01175 ± 0.00035	0.01189 ± 0.00024	0.01184 ± 0.00054	0.01203 ± 0.00050	0.01194 ± 0.00064	0.01166 ± 0.00046	0.01189 ± 0.00039	0.01170 ± 0.00058
GRUPO T1	DÍA 1	0.00534 ± 0.00045	0.00548 ± 0.00045	0.00566 ± 0.00046	0.00548 ± 0.00039	0.00548 ± 0.00054	0.00548 ± 0.00039	0.00543 ± 0.00032	0.00557 ± 0.00047
	DÍA 2	0.00553 ± 0.00043	0.00566 ± 0.00056	0.00543 ± 0.00055	0.00566 ± 0.00026	0.00571 ± 0.00043	0.00576 ± 0.00050	0.00525 ± 0.00037	0.00552 ± 0.00048
	DÍA 3	0.00679 ± 0.00051	0.00688 ± 0.00045	0.00660 ± 0.00055	0.00669 ± 0.00062	0.00674 ± 0.00067	0.00689 ± 0.00050	0.00679 ± 0.00025	0.00684 ± 0.00033
	DÍA 4	0.00829 ± 0.00049	0.00842 ± 0.00069	0.00824 ± 0.00054	0.00838 ± 0.00034	0.00810 ± 0.00039	0.00839 ± 0.00060	0.00843 ± 0.00059	0.00815 ± 0.00045
	DÍA 5	0.01011 ± 0.00045	0.01011 ± 0.00059	0.01049 ± 0.00033	0.01035 ± 0.00052	0.01026 ± 0.00056	0.01002 ± 0.00054	0.01049 ± 0.00050	0.01025 ± 0.00053
	DÍA 6	0.01105 ± 0.00060	0.01100 ± 0.00058	0.01086 ± 0.00048	0.01100 ± 0.00070	0.01110 ± 0.00050	0.01096 ± 0.00064	0.01115 ± 0.00057	0.01100 ± 0.00060
	DÍA 7	0.01213 ± 0.00050	0.01212 ± 0.00045	0.01217 ± 0.00044	0.01222 ± 0.00047	0.01218 ± 0.00050	0.01209 ± 0.00038	0.01222 ± 0.00041	0.01236 ± 0.00025
GRUPO T2	DÍA 1	0.00529 ± 0.00050	0.00520 ± 0.00052	0.00524 ± 0.00043	0.00534 ± 0.00050	0.00539 ± 0.00046	0.00525 ± 0.00043	0.00510 ± 0.00033	0.00529 ± 0.00045
	DÍA 2	0.00604 ± 0.00041	0.00590 ± 0.00051	0.00604 ± 0.00035	0.00599 ± 0.00037	0.00604 ± 0.00034	0.00600 ± 0.00053	0.00609 ± 0.00054	0.00604 ± 0.00035
	DÍA 3	0.00684 ± 0.00045	0.00674 ± 0.00051	0.00679 ± 0.00045	0.00702 ± 0.00049	0.00702 ± 0.00044	0.00698 ± 0.00034	0.00693 ± 0.00049	0.00702 ± 0.00045
	DÍA 4	0.00829 ± 0.00023	0.00852 ± 0.00048	0.00843 ± 0.00044	0.00838 ± 0.00034	0.00811 ± 0.00039	0.00839 ± 0.00061	0.00852 ± 0.00048	0.00829 ± 0.00031
	DÍA 5	0.01424 ± 0.00051	0.01451 ± 0.00067	0.01451 ± 0.00070	0.01414 ± 0.00087	0.01414 ± 0.00062	0.01429 ± 0.00068	0.01452 ± 0.00085	0.01451 ± 0.00096
	DÍA 6	0.01971 ± 0.00060	0.01998 ± 0.00069	0.01938 ± 0.00059	0.01952 ± 0.00035	0.01943 ± 0.00077	0.01981 ± 0.00062	0.01976 ± 0.00039	0.01971 ± 0.000144
	DÍA 7	0.02599 ± 0.00056	0.02644 ± 0.00083	0.02655 ± 0.00083	0.02631 ± 0.00052	0.02632 ± 0.00077	0.02633 ± 0.00072	0.02637 ± 0.00082	0.02650 ± 0.00105

TABLA 3
DENSIDAD DE CÉLULAS (+) PARA HIF-1 α EN EL EPITELIO BRANQUIAL (n^o cel/ μ m²)
PROMEDIOS \pm DESVIACIONES ESTÁNDAR

		ARCOS DERECHOS				ARCOS IZQUIERDOS			
		Arco I	Arco II	Arco III	Arco IV	Arco I	Arco II	Arco III	Arco IV
GRUPO T1	DÍA 1	0.00092 \pm 0.00045	0.00091 \pm 0.00041	0.00098 \pm 0.00049	0.00094 \pm 0.00047	0.00094 \pm 0.00031	0.00097 \pm 0.00043	0.00092 \pm 0.00047	0.00092 \pm 0.00048
	DÍA 2	0.00167 \pm 0.00037	0.00177 \pm 0.00053	0.00161 \pm 0.00048	0.00167 \pm 0.00059	0.00142 \pm 0.00054	0.00157 \pm 0.00056	0.00157 \pm 0.00048	0.00167 \pm 0.00051
	DÍA 3	0.00233 \pm 0.00046	0.00243 \pm 0.00039	0.00214 \pm 0.00051	0.00233 \pm 0.00067	0.00253 \pm 0.00041	0.00243 \pm 0.00079	0.00233 \pm 0.00082	0.00243 \pm 0.00041
	DÍA 4	0.00476 \pm 0.00037	0.00467 \pm 0.00047	0.00438 \pm 0.00039	0.00408 \pm 0.00064	0.00467 \pm 0.00094	0.00476 \pm 0.00062	0.00486 \pm 0.00052	0.00428 \pm 0.00052
	DÍA 5	0.00807 \pm 0.00071	0.00826 \pm 0.00068	0.00797 \pm 0.00067	0.00836 \pm 0.00078	0.00817 \pm 0.00086	0.00807 \pm 0.00089	0.00758 \pm 0.00092	0.00807 \pm 0.00082
	DÍA 6	0.01001 \pm 0.00084	0.0104 \pm 0.00078	0.01069 \pm 0.00085	0.01011 \pm 0.00072	0.00982 \pm 0.00082	0.01001 \pm 0.00071	0.01050 \pm 0.00077	0.01040 \pm 0.00081
	DÍA 7	0.01244 \pm 0.00061	0.01283 \pm 0.00079	0.01274 \pm 0.00077	0.01264 \pm 0.00073	0.01283 \pm 0.00098	0.01215 \pm 0.00092	0.01254 \pm 0.00090	0.01244 \pm 0.00073
GRUPO T2	DÍA 1	0.00199 \pm 0.00049	0.0019 \pm 0.00044	0.00188 \pm 0.00045	0.00182 \pm 0.00037	0.00150 \pm 0.00061	0.00163 \pm 0.00082	0.00167 \pm 0.00078	0.00172 \pm 0.00081
	DÍA 2	0.01013 \pm 0.00048	0.01089 \pm 0.00082	0.00982 \pm 0.00089	0.01069 \pm 0.00079	0.01060 \pm 0.00086	0.01099 \pm 0.00093	0.01040 \pm 0.00083	0.01011 \pm 0.00083
	DÍA 3	0.0139 \pm 0.00089	0.01429 \pm 0.00072	0.01332 \pm 0.00075	0.01371 \pm 0.00071	0.01371 \pm 0.00090	0.01361 \pm 0.00082	0.01371 \pm 0.00093	0.01341 \pm 0.00088
	DÍA 4	0.01721 \pm 0.00083	0.01643 \pm 0.00064	0.01721 \pm 0.00085	0.01585 \pm 0.00068	0.01701 \pm 0.00075	0.01662 \pm 0.00092	0.01682 \pm 0.00083	0.01614 \pm 0.00075
	DÍA 5	0.02041 \pm 0.00089	0.02022 \pm 0.00094	0.02071 \pm 0.00074	0.02051 \pm 0.00064	0.02100 \pm 0.00100	0.01983 \pm 0.00094	0.02042 \pm 0.00093	0.02032 \pm 0.00086
	DÍA 6	0.02391 \pm 0.000831	0.02313 \pm 0.00092	0.02392 \pm 0.00093	0.02304 \pm 0.00076	0.02352 \pm 0.00095	0.02333 \pm 0.00082	0.02401 \pm 0.00092	0.02294 \pm 0.00090
	DÍA 7	0.02731 \pm 0.00065	0.02673 \pm 0.00088	0.02673 \pm 0.00099	0.02654 \pm 0.00091	0.02702 \pm 0.00108	0.02683 \pm 0.00093	0.02712 \pm 0.00081	0.02663 \pm 0.00093

TABLA 4
ÁREA VASCULAR BRANQUIAL (μm^2)
PROMEDIOS \pm DESVIACIONES ESTÁNDAR

		ARCOS DERECHOS				ARCOS IZQUIERDOS			
		Arco I	Arco II	Arco III	Arco IV	Arco I	Arco II	Arco III	Arco IV
GRUPO C	DÍA 1	3417.0 \pm 37.7	3416.9 \pm 37.3	3417.7 \pm 37.2	3419.0 \pm 37.4	3417.9 \pm 37.0	3417.4 \pm 40.1	3416.9 \pm 34.6	3419.7 \pm 36.5
	DÍA 2	4130.0 \pm 61.5	4129.4 \pm 61.5	4129.6 \pm 63.4	4128.5 \pm 66.8	4129.7 \pm 58.5	4128.8 \pm 60.3	4129.1 \pm 61.0	4129.6 \pm 59.3
	DÍA 3	4971.5 \pm 56.1	4969.3 \pm 55.0	4968.3 \pm 49.3	4969.1 \pm 53.6	4969.2 \pm 57.0	4972.6 \pm 58.0	4969.7 \pm 47.8	4970.0 \pm 55.1
	DÍA 4	5845.4 \pm 52.0	5843.0 \pm 46.7	5844.2 \pm 48.0	5845.1 \pm 49.4	5843.8 \pm 51.2	5846.5 \pm 52.0	5844.3 \pm 50.6	5847.6 \pm 49.0
	DÍA 5	6854.7 \pm 54.4	6853.8 \pm 55.0	6856.8 \pm 54.0	6853.9 \pm 56.6	6854.7 \pm 55.0	6853.9 \pm 51.0	6855.7 \pm 58.3	6856.5 \pm 57.2
	DÍA 6	7237.1 \pm 85.3	7236.9 \pm 86.1	7241.6 \pm 84.0	7235.1 \pm 80.4	7234.6 \pm 86.3	7235.9 \pm 84.0	7241.9 \pm 84.3	7240.3 \pm 82.1
	DÍA 7	7679.3 \pm 84.0	7683.4 \pm 87.0	7676.9 \pm 88.0	7682.2 \pm 86.0	7684.7 \pm 86.0	7683.9 \pm 85.0	7677.1 \pm 83.0	7679.1 \pm 85.0
GRUPO T1	DÍA 1	3419.5 \pm 37.1	3418.4 \pm 37.0	3418.2 \pm 37.7	3419.6 \pm 35.3	3419.5 \pm 35.0	3418.8 \pm 34.9	3418.8 \pm 37.5	3420.0 \pm 36.6
	DÍA 2	4132.4 \pm 92.7	4133.7 \pm 93.2	4131.3 \pm 93.6	4131.9 \pm 90.6	4131.2 \pm 93.9	4132.5 \pm 93.7	4131.9 \pm 93.1	4132.7 \pm 94.2
	DÍA 3	9305.8 \pm 63.0	9309.4 \pm 61.4	9307.1 \pm 64.3	9305.5 \pm 68.0	9305.0 \pm 62.6	9305.8 \pm 65.7	9304.9 \pm 67.1	9306.6 \pm 62.0
	DÍA 4	9860.4 \pm 36.0	9868.0 \pm 34.5	9859.9 \pm 33.4	9863.2 \pm 34.1	9865.0 \pm 33.8	9862.5 \pm 31.1	9863.8 \pm 33.0	9862.5 \pm 34.0
	DÍA 5	12274.4 \pm 457.4	12294.6 \pm 439.8	12384.0 \pm 497.2	12366.2 \pm 513.0	12265.4 \pm 457.6	12344.4 \pm 496.3	12380.6 \pm 500.0	12367.4 \pm 513.3
	DÍA 6	16840.0 \pm 895.3	16841.3 \pm 891.1	16837.7 \pm 831.8	16844.3 \pm 870.4	16839.3 \pm 878.2	16838.1 \pm 925.0	16842.9 \pm 889.7	16840.3 \pm 854.7
	DÍA 7	20328.7 \pm 754.7	20318.7 \pm 778.1	20326.9 \pm 735.6	20329.0 \pm 764.6	20322.2 \pm 762.0	20330.9 \pm 744.9	20326.4 \pm 749.0	20326.9 \pm 756.3
GRUPO T2	DÍA 1	5319.1 \pm 26.2	5322.1 \pm 19.0	5320.5 \pm 26.0	5320.1 \pm 24.3	5320.7 \pm 19.8	5324.1 \pm 19.9	5314.6 \pm 24.8	5320.4 \pm 22.4
	DÍA 2	7839.6 \pm 50.9	7838.1 \pm 50.1	7833.2 \pm 59.5	7835.1 \pm 59.7	7837.6 \pm 50.7	7834.7 \pm 58.8	7839.3 \pm 49.8	7839.5 \pm 50.8
	DÍA 3	11400.4 \pm 372.6	11399.6 \pm 375.0	11401.7 \pm 359.8	11398.1 \pm 365.5	11400.7 \pm 362.9	11397.6 \pm 364.3	11399.3 \pm 370.4	11401.9 \pm 365.7
	DÍA 4	14804.2 \pm 299.8	14804.0 \pm 303.0	14804.1 \pm 294.7	14803.2 \pm 301.0	14803.1 \pm 292.5	14804.3 \pm 297.6	14805.6 \pm 295.4	14803.9 \pm 299.7
	DÍA 5	17494.7 \pm 414.2	17494.9 \pm 410.5	17494.9 \pm 415.4	17493.6 \pm 412.0	17494.7 \pm 406.9	17493.1 \pm 418.1	17493.0 \pm 416.9	17493.3 \pm 415.0
	DÍA 6	20298.9 \pm 336.7	20301.4 \pm 394.0	20301.6 \pm 329.2	20296.7 \pm 342.8	20302.4 \pm 346.4	20301.1 \pm 359.0	20299.3 \pm 347.8	20301.5 \pm 343.3
	DÍA 7	24946.9 \pm 637.3	24944.1 \pm 637.8	24946.8 \pm 636.5	24948.8 \pm 636.1	24870.5 \pm 634.8	24943.5 \pm 632.9	24942.3 \pm 653.1	24945.6 \pm 632.7

TABLA 5
COEFICIENTES DE CORRELACIÓN DE PEARSON (r) Y NIVELES DE SIGNIFICANCIA (p) ENTRE LAS
VARIABLES DENSIDAD DE CÉLULAS (+) PARA HIF-1 α Y ÁREA VASCULAR BRANQUIAL.
GRUPOS T1 Y T2

VARIABLES	Arco der I vasos	Arco der II vasos	Arco der III vasos	Arco der IV vasos	Arco izq I vasos	Arco izq II vasos	Arco izq III vasos	Arco izq IV vasos
Arco der I HIF+	r= 0.892 p= 0.000	r= 0.892 p= 0.000	r= 0.892 p= 0.000	r= 0.892 p= 0.000	r= 0.892 p= 0.000	r= 0.892 p= 0.000	r= 0.892 p= 0.000	r= 0.892 p= 0.000
Arco der II HIF+	r= 0.892 p= 0.000	r= 0.892 p= 0.000	r= 0.892 p= 0.000	r= 0.892 p= 0.000	r= 0.892 p= 0.000	r= 0.892 p= 0.000	r= 0.892 p= 0.000	r= 0.892 p= 0.000
Arco der III HIF+	r= 0.889 p= 0.000	r= 0.889 p= 0.000	r= 0.889 p= 0.000	r= 0.889 p= 0.000	r= 0.889 p= 0.000	r= 0.889 p= 0.000	r= 0.889 p= 0.000	r= 0.889 p= 0.000
Arco der IV HIF+	r= 0.890 p= 0.000	r= 0.890 p= 0.000	r= 0.890 p= 0.000	r= 0.890 p= 0.000	r= 0.890 p= 0.000	r= 0.890 p= 0.000	r= 0.890 p= 0.000	r= 0.890 p= 0.000
Arco izq I HIF+	r= 0.891 p= 0.000	r= 0.891 p= 0.000	r= 0.891 p= 0.000	r= 0.891 p= 0.000	r= 0.891 p= 0.000	r= 0.891 p= 0.000	r= 0.891 p= 0.000	r= 0.891 p= 0.000
Arco izq II HIF+	r= 0.889 p= 0.000	r= 0.889 p= 0.000	r= 0.889 p= 0.000	r= 0.889 p= 0.000	r= 0.889 p= 0.000	r= 0.889 p= 0.000	r= 0.889 p= 0.000	r= 0.889 p= 0.000
Arco izq III HIF+	r= 0.890 p= 0.000	r= 0.890 p= 0.000	r= 0.889 p= 0.000	r= 0.889 p= 0.000	r= 0.890 p= 0.000	r= 0.890 p= 0.000	r= 0.889 p= 0.000	r= 0.889 p= 0.000
Arco izq IV HIF+	r= 0.895 p= 0.000	r= 0.894 p= 0.000	r= 0.894 p= 0.000	r= 0.894 p= 0.000	r= 0.895 p= 0.000	r= 0.894 p= 0.000	r= 0.894 p= 0.000	r= 0.894 p= 0.000