UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Expresión de la proteína ET-1 en pulmones de pollos de engorde sanos y enfermos con Hipertensión arterial pulmonar por hipoxia hipobárica

Luis Carlos Monroy Gutiérrez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia
Bogotá, Colombia
2013

Expresión de la proteína ET-1 en pulmones de pollos de engorde sanos y enfermos con Hipertensión Arterial Pulmonar por hipoxia hipobárica

Luis Carlos Monroy Gutiérrez

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Salud Animal

Director (a):

DMV, M.Sc., Ph.D. Aureliano Hernández Vásquez

Línea de Investigación:

Fisiopatología Veterinaria

Grupo de Investigación:

Biología de la adaptación de los animales al trópico

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia

Bogotá, Colombia

2013

La vida esta llena de oportunidades,
donde la inteligencia resplandece
al contacto con las dificultades
y la sabiduría satisface las grandes esperanzas y
los más anhelados deseos.

Con todo mi amor para mi adorada esposa Jennifer Paola

A mis padres Gustavo y María Gloria

Agradecimientos

A los doctores Aureliano Hernández Vásquez y Martha Moreno de Sandino, quienes participaron activamente como directores del trabajo de investigación y por su valiosa tutoría y por su dedicación.

Al Doctor Edgar Reyes del grupo de investigación en proteínas de la Facultad de Ciencias por su inmensa ayuda, disposición y colaboración.

A la Doctora Nhora María Martínez Rueda por su valiosa asesoría en el análisis estadístico.

Al señor Tito Rodriguez y Camilo Galindo, por su inmensa colaboración en el desarrollo del experimento en el Edificio Avícola.

Al Laboratorio de Patología Aviar, la Dra Martha Pulido, por su inmensa ayuda y apoyo.

A la empresa Pollo Andino Ltda, al doctor Gustavo Granados por la colaboración en la granja de Nilo.

A la empresa Incubacol S.A., por la donación de los animales experimentales.

Al Laboratorio de equipos comunes de la Facultad de Medicina.

A la doctora Jenny Amaya del Laboratorio de Patología de la Facultad de Medicina, por su invaluable colaboración en la realización de la inmunohistoquímica.

A la DIB Bogotá por la financiación del proyecto de investigación.

A mi querida esposa, por su paciencia y tolerancia durante la Maestría y por ese apoyo incondicional y esas palabras de aliento y ánimo para culminar esta etapa.

Resumen

La hipoxia hipobárica es un factor desencadenante de la Hipertensión Arterial Pulmonar en pollos de engorde, esta enfermedad tiene un gran impacto económico en la avicultura. Se criaron pollos de engorde de una estirpe comercial a 2638 m.s.n.m. y a 310 m.s.n.m. y se determinó el efecto de exposición a la hipoxia hipobárica sobre la incidencia de HAP, así mismo, se identificó y se comparó los niveles de expresión de la proteína ET-1 en arterias pulmonares de pollos de engorde sanos y enfermos por HAP mediante la inmunohistoquímica. Los pollos mantenidos en normoxia relativa tuvieron una mortalidad acumulada del 1%; no presentaron lesiones compatibles con HAP y la expresión de la proteína ET-1 fue muy baja. Los pollos en hipoxia hipobárica presentaron una mortalidad acumulada al día 42 de edad en machos fue del 35,2% y en hembras del 53,8%. La HAP fue la responsable del 90,6% de la mortalidad total en los machos y en las hembras del 96,4%. En la altura el 64% de los pollos desarrolló HAP (IC>25), el 32% presentó ascitis y el 82% evidenció hidropericardio,. El tiempo de exposición a la hipoxia hipobárica no influye sobre la forma de presentación y no afecta la manifestación de la enfermedad y la susceptibilidad a la muerte por causa de HAP se debe a un factor individual de adaptación. No hubo ninguna relación entre el IC y la edad de muerte espontánea (r=0,026). La altura tuvo efecto sobre el IC (p<0,01), se observó mayor IC en los pollos de engorde criados en hipoxia hipobárica. La expresión de la proteína ET-1 fue mayor en los pollos expuestos a hipoxia hipobárica (p<0,01), así mismo, los pollos enfermos por HAP presentaron mayor expresión de la proteína ET-1 en las arterias pulmonares comparado con los animales sanos (p<0,01). La expresión de la ET-1 en arterias pulmonares se puede sugerir como el factor clave en la patogénesis de la HAP, así como, en la respuesta de los pollos a las condiciones ambientales de hipoxia hipobárica y en la adaptación de los animales a la altura.

Palabras clave: Hipertensión Arterial Pulmonar, Pollos, Endotelina 1, Expresión, Proteína.

Abstract

Hypobaric hypoxia is a determining cause for pulmonary arterial hypertension (PAH) in broilers, this disease has a major economic impact on the poultry. Broilers of a commercial strain were reared in 2638 masl and at 310 masl. The chickens in normoxia had mortality of 1%, no lesions consistent with PAH and protein expression of ET-1 was very low. Chickens in hypobaric hypoxia showed mortality of 35.2% in males and 53.8% in females at day 42 of age, the PAH was responsible for 90.6% of total mortality in males and 96.4% females. In the height the 64% of chicken developed PAH (Cardiac index, CI> 25), 32% had ascites and 82% showed hydropericardium. The time of exposure to hypobaric hypoxia doesn't influence in the presentation and doesn't affect the manifestation of the disease, so the susceptibility to death from HAP is due to individual factor of adaptation. There wasn't relationship between the CI and the age of spontaneous death ($r = -0.064$). The height had effect on the IC ($p < 0.01$), broilers reared in hypobaric hypoxia showed higher CI. The protein expression of ET-1 was higher in chickens exposed to hypobaric hypoxia ($p < 0.01$), likewise, sick chickens with PAH showed increased expression of ET-1 protein in pulmonary arteries compared with animals healthy ($p < 0.01$). The expression of ET-1 in pulmonary arteries can be suggested as the key factor in the pathogenesis of PAH, as well as in the response of chickens to environmental conditions of hypobaric hypoxia and in the adaptation of animals to the height.

Keywords:

Pulmonary Hypertensión Arterial, Chicken, Endothelin 1, Expression, Protein.

Contenido

Pág.

Resumen ..... **IX**

Lista de figuras ..... **XIII**

Lista de tablas ..... **XV**

Lista de Símbolos y abreviaturas ..... **XVI**

Introducción **18**
Objetivos: 20
Objetivo general: 20
Objetivos específicos: 20

1. Hipertensión Arterial Pulmonar, Estado del Arte: **21**
1.1 Introducción 21
1.2 Fisiopatología 23
1.3 El endotelio en la HAP 24
1.4 La disfunción endotelial en la HAP 26
1.5 Endotelina (ET) 28
1.6 Óxido Nítrico (NO) 33

2 Efecto de la exposición a la hipoxia hipobárica sobre la presentación de Hipertensión Arterial Pulmonar en pollos de engorde **41**
2.1 Resumen 41
2.2 Introducción: 42
2.3 Materiales y Métodos: 44
2.4 Resultados: 47
2.5 Discusión: 54
2.6 Bibliografía 55

3 Expresión de la proteína ET-1 en arterias pulmonares de pollos de engorde expuestos a hipoxia hipobárica **59**
3.1 Resumen 59
3.2 Introducción 60
3.3 Materiales y métodos 66
3.4 Resultados 70
3.5 Discusión 79
3.6 Bibliografía 82

4. Conclusiones 87
4.1 Conclusiones 87

Bibliografía 89

Lista de figuras

Pág.

Figura 2-1. Temperatura ambiental expresada en grados Celsius (°C) del galpón a 2638 m.s.n.m. 45
Figura 2-2. Hallazgos macroscópicos en los pollos enfermos por HAP 48
Figura 2-3 .Hallazgos a la necropsia características de HAP:.....49
Figura 2-4. Porcentaje de mortalidad diaria de la hembra y del macho en las aves expuestas a hipoxia hipobárica. 50
Figura 2-5. Relación entre la tasa de mortalidad relativa y la ganancia de peso semanal en las hembras mantenidas bajo condiciones de hipoxia hipobárica. 50
Figura 2-6. Peso corporal de las aves a los 33 días de edad según la altura de crianza. 51
Figura 2-7. Relación entre la edad de mortalidad espontánea y el índice cardiaco de los pollos machos. 52
Figura 2-8. Valor del índice cardiaco de aves según la altura de crianza.....53
Figura 2-9. Valores del índice cardiaco según el grado de severidad de hidropericardio. 54
Figura 3-1. Temperatura ambiental (°C) del galpón a 2638 m.s.n.m.....67
Figura 3-2. Hallazgos macroscópicos característicos de HAP 73
Figura 3-3. Peso corporal de las aves a los 33 días de edad según la altura de crianza. 74
Figura 3-4. Valor del índice cardiaco de aves criadas a 310 y 2638 m.s.n.m. 74
Figura 3-5. Cortes histológicos de pulmón de animales sanos y enfermos con HAP. 75
Figura 3-6. Inmunohistoquímica de arteriolas pulmonares de pollos coloreadas para ET-1. 76
Figura 3-7. Análisis morfométrico de la IHQ de ET-1 en arteriolas pulmonares de pollos. 77
Figura 3-8. Expresión de la proteína ET-1 en pollos de engorde expuestos a hipoxia hipobárica natural. 78
Figura 3-9. Expresión de la proteína ET-1 en pollos de engorde según el grupo experimental. 79

Lista de tablas

Pág.

Tabla 2-1. Grupos experimentales según la altura sobre el nivel del mar de crianza y la presentación de HAP.....46
Tabla 2-2.Valores del índice cardiaco según el grado de severidad de ascitis en pollos con HAP.....52
Tabla 2-3. Valores del índice cardiaco según el grupo experimental 53
Tabla 3-1. Grupos experimentales según la altura sobre el nivel del mar de crianza y la presentación de HAP.....68
Tabla 3-2. Índice cardiaco, grupo experimental, sexo de los pollos utilizados en la inmunohistoquímica de ET-1. 70
Tabla 3-3. Resumen del modelo completamente al azar para el factor Altura 71
Tabla 3-4. Resumen del modelo completamente al azar para el factor Grupo experimental 71
Tabla 3-5. Valores del índice cardiaco según el grupo experimental 75
Tabla 3-6. Valores del índice cardiaco y expresión de ET-1 en pollos según el grupo experimental.....78

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
Msnm	Metros sobre el nivel del mar
HAP	Hipertensión Arterial Pulmonar
ET-1	Endotelina 1
ETA	Receptor tipo A de la endotelina
ETB	Receptor ripo B de la endotelina
NO	Óxido Nítrico
eNOS	Sintasa de óxido nítrico endotelial
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducida
bNOS	Sintasa de óxido nítrico cerebral
TxA2	Tromboxano A2
PGI2	Prostaglandina I2 o Prostaciclina
IHQ	Immunohistoquímica

Introducción

La Hipertensión Arterial Pulmonar (HAP) inducida por la hipoxia hipobárica afecta de manera significativa los pollos de engorde. En las aves con HAP hay mayor contracción y remodelación de las arterias pulmonares, aumento del gasto cardiaco y de la masa muscular del ventrículo derecho, congestión pasiva en la circulación de retorno, algunas veces se evidencia ascitis e hidropericardio y las aves afectadas mueren por falla cardiaca.

La HAP en pollos de engorde es un problema económico serio; Maxwell y Robertson (1997), reportaron la presentación de HAP en 18 países de 4 continentes en los que afecta al 4,7% de los pollos del todo el mundo. Solís de los Santos *et al* (2005), consideraron que la producción avícola mundial cada año era de 40 billones de pollos de engorde y Guo *et al* (2007), plantearon que la HAP era responsable del 25% de la mortalidad total. Arce (1998), afirmó que para 1995, el 70% del total de las explotaciones de pollo de engorde de México, es decir unos 630 millones de aves se localizaban en zonas altas y que se reportaba una mortalidad de 3% a causa de la enfermedad. En Estados Unidos, se registraron mortalidades en las aves del 2 a 5%, con pérdidas de alrededor de los 100 millones de dólares anuales (Bottje *et al*. 1995). En Canadá se estimó en el 2004 que la mortalidad debida a HAP en la industria de pollo mundial generó pérdidas del orden de $ 500 billones de dólares por año (*Agriculture and Agri-Food*, Canadá, 2004; *Chicken Farmers of Canada*, 2004.).

La importancia económica de la HAP está centrada principalmente por la mortalidad, el porcentaje de decomisos en las plantas de sacrificio, la pobre conversión alimenticia y el deterioro en el estado de salud de las aves que las predispone a patologías de tipo secundario; por otra parte, las pérdidas económicas en las explotaciones de pollo de engorde también se relacionan con la aplicación de medidas preventivas para mitigar los efectos de la enfermedad, como por ejemplo los planes de restricción alimenticia que

buscan un retardo en el crecimiento inicial, pero que generan ciclos de producción de mayor duración, lo que aumenta los costos de producción.

En la actualidad las empresas de pollo de engorde en Colombia tienen parámetros productivos esperados, diferentes según la altura sobre el nivel del mar a la cual se crían los pollos de engorde; bajo condiciones de salud estables, en la Sabana de Bogotá (2638 msnm) se realizan planes de restricción alimenticia severos y se alcanza un peso promedio de machos y hembras de 2000 g a los 40 días de edad, con una mortalidad total esperada del 6%, mientras en las zonas bajas (Villavicencio, 500msnm) la mortalidad esperada es del 3% y 2000 g. a los 36 días; además, el costo de producción para el año 2012 del kilogramo de pollo vivo en pie a los 40 días en zonas altas es de $ 2900 pesos colombianos, mientras que en las bajas es de $ 2700 pesos, con la anterior información podemos deducir que las pérdidas económicas en Colombia como consecuencia de la HAP son muy altas; sin embargo, se necesita más información para poder hacer las estimaciones necesarias del impacto económico real de la enfermedad.

En la vasculatura arterial pulmonar, el endotelio juega un papel fundamental en el control del tono vascular local; por otra parte, la hipoxia provoca una disfunción endotelial en la arterias y arteriolas pulmonares provocando un imbalance en la producción de sustancias vasoactivas como la Endotelina 1 (ET-1) y el Óxido Nítrico (NO), conllevando a vasoconstricción y remodelación estructural de la pared vascular. En estudios previos se ha demostrado que la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS, por sus siglas en inglés Endothelial Nitric Oxide Synthase), la enzima encargada de la transformación del aminoácido L-arginina a óxido nítrico (NO) y L-citrulina, se expresa en menor proporción en las arteriolas pulmonares de los pollos de engorde enfermos con HAP comparados con los sanos por medio de la histoquímica (Moreno y Hernández, 2003) y de la expresión del mRNA en qPCR (Gómez *et al*., 2007). De la misma forma, la expresión del mRNA de la Endotelina-1 (ET-1) y el Receptor tipo A de la endotelina (ET-A) está aumentada en pollos enfermos con HAP en comparación con los sanos (Gómez *et al*., 2007); esta menor expresión génica de la eNOS y mayor expresión de la ET-1 en los pollos enfermos, causa un efecto vasoconstrictor de la vasculatura pulmonar y estimula la mitosis de las células musculares lisas ocasionando la remodelación del lecho pulmonar. Sin embargo, aún no se conoce el patrón de expresión de las proteínas traducidas de

dichos genes en pollos de engorde sanos y con HAP de origen hipóxico. La presente investigación está encaminada a conocer la expresión de la proteína ET-1 en el pulmón de pollos de engorde sometidos a las condiciones medioambientales propias de las zonas ubicadas a 2638 msnm y determinar si existen diferencias entre pollos sanos y enfermos con HAP; así mismo, determinar la expresión de estas proteínas en pollos de engorde criados en normoxia relativa.

Al mismo tiempo, Colombia tiene la ventaja de ser un laboratorio natural, debido a la diversidad de altitudes y microclimas presentes; de esta forma, se facilita la investigación en HAP y la realización de estudios *in vivo* sobre los cambios fisiológicos y patológicos de pollos de engorde expuestos a condiciones naturales de hipoxia hipobárica

Objetivos:

Objetivo general:

Identificar y comparar los niveles de expresión de la proteína ET-1 en arteriolas pulmonares de pollos de engorde sanos sometidos a normoxia relativa e hipoxia hipobárica, entre estos dos grupos y con los valores obtenidos en pollos con HAP expuestos a hipoxia hipobárica.

Objetivos específicos:

- Evaluar las manifestaciones clínicas y hallazgos a la necropsia de pollos de engorde expuestos a hipoxia hipobárica y la incidencia de la exposición a la hipoxia hipobárica en la presentación de HAP en pollos de engorde

- Identificar la ubicación de la proteína ET-1 en las arterias y arteriolas pulmonares, cuantificar y comparar los niveles de su expresión en pollos de engorde sanos sometidos a normoxia relativa e hipoxia hipobárica.

1. Hipertensión Arterial Pulmonar, Estado del Arte:

1.1 Introducción

La Hipertensiòn Arterial Pulmonar (HAP) de origen hipóxico es una enfermedad que afecta a múltiples especies animales incluyendo al hombre; el pollo de engorde se caracteriza por ser muy susceptible a desarrollar la enfermedad cuando se somete a ambientes de hipoxia crónica. En humanos es una enfermedad incurable caracterizada por una alta mortalidad, debido a la gran cantidad de personas que habitan en las grandes alturas; la entidad ha sido declarada un problema de salud pública que afecta potencialmente a más de 140 millones de personas que viven en alturas superiores a 2.000 msnm; de éstas, 80 millones viven en el Himalaya Asiático, alrededor de 35 millones en los Andes de América del Sur y el resto habita en las montañas Rocosas de América del Norte (Peñaloza y Arias, 2007). Por representar una grave y hasta ahora incurable enfermedad en los humanos, es de vital importancia conocer y entender su patogénesis con el fin tratar de controlarla.

El pollo de engorde tiene una marcada susceptibilidad a la hipoxia hipobárica y cuando son criados en las grandes alturas pueden desarrollar el síndrome de hipertensión arterial pulmonar (HAP). La causa de este síndrome es la hipoxia, debida a la baja tensión de oxígeno atmosférico (Cueva *et al,* 1974). La HAP se presenta principalmente en las explotaciones comerciales situadas a una altura superior a los 1300 m.s.n.m. (Cueva *et al*, 1974; Marín, 1980; Villaseñor, 1980; Useche et al, 1981; López, 1982; Hernández, 1987; Maxwell *et al,* 1990; Arce, 1998) y en Latinoamérica los primeros reportes se hicieron en países como Perú (Hung *et al*, 1973), Colombia (Hernández, 1979), Bolivia (Rengifo, 1979) y México (López, 1982).

El síndrome de HAP se puede presentar en cualquier edad, pero hay mayor ocurrencia en la tercera y cuarta semanas (Hernández, 1982; López, 1982; Moreno & Hernández, 1996), también puede ser inducido muy temprano en el periodo embrionario (Monge & Velarde, 2003). La mortalidad es variable; en Colombia se reportó del 8% (Hernández, 1982), en México hasta del 35% (López, 1982). En 1994, varios autores reportaron una

mortalidad acumulada de entre 15 a 35.6% (Anthony *et al*, 1994; Balog *et al*, 1994). Actualmente hay reportes de Areiza *et a* (2011) quienes informaron en un grupo de machos de la estirpe Cobb criados a 2638 m.s.n.m. al día 24 de edad, una mortalidad total del 11,73% de la cual el 9,18% estuvo asociada con HAP. Así mismo, Vásquez y Hernández (2010), en investigaciones con pollos de engorde de la estirpe Cobb 500 encontraron que todos los grupos evaluados presentaron alta mortalidad a causa de HAP, en un rango entre 18.92% y 38.8%,

Se ha discutido una aparente diferencia de susceptibilidad a desarrollar el síndrome de HAP entre diversas estirpes de pollo de engorde (Hernández, 1982). Sillau & Montalvo (1982), reportaron una adaptación genética a la gran altura en pollos de engorde, después de la exposición a la altura por varias generaciones. Huchzemeyer *et al,* (1988) encontraron diferencias en la susceptibilidad a la hipoxia en diferentes estirpes comerciales de pollo de engorde, la cual solamente puede ser explicada como de origen genético. Moreno & Hernández (1984) compararon la respuesta a condiciones de hipoxia crónica de la estirpe comercial Arbor Acres con la de pollos criollos nacidos y criados en altura (2638 m.s.n.m.) y encontraron que los pollos criollos no desarrollaron HAP, mientras que los Arbor Acres criados a la misma altura si la desarrollan; los autores explican los resultados del experimento como la consecuencia de la adaptación a la altura por parte de los animales nativos. Los pollos hiporreactivos a la hipoxia crónica lo son, gracias a un proceso adaptativo por su permanencia prolongada en las grandes alturas y la adaptación ha sido trasmitida en las generaciones sucesivas, manteniendo el principio de selección natural propuesta por Darwin; de esta forma, la respuesta de los pollos a las condiciones ambientales de hipoxia hipobárica varía de acuerdo con el grado de adaptación que tales animales tengan a la gran altura (Moreno & Hernandez, 1984).

La temperatura ambiental también es un factor desencadenante de HAP en pollos de engorde susceptibles (Rengifo, 1979; Mejia, 1982; Hernández, 1984; Pan *et al,* 2005; Daneshyar *et al*, 2009). Gonzales *et al* (1998) en un experimento realizado en Brasil durante el invierno, reportaron una mortalidad acumulada entre el 5,1 y el 12,96% a los 42 días en algunas estirpes de pollos de engorde de rápido crecimiento (Cobb, Ross, Arbor Acres, Hubbard); mientras que en pollos *Label Rouge* (Cuello desnudo, aves nativas) fue del 1,85%, y que más del 50% de esta mortalidad fue debida a HAP.

1.2 Fisiopatología

La enfermedad ha recibido varios nombres como; “Edema Aviar”, “Ascitis Aviar”, “Síndrome Ascítico del Pollo”, “Ascitis secundaria a insuficiencia cardiaca”, generalmente por su signo clínico más común, la ascitis, pero este signo se presenta en múltiples patologías, una de ellas y la más importante es la HAP, por esa razón el nombre más apropiado para esta enfermedad es Hipertensión Arterial Pulmonar (HAP) o Síndrome de Hipertensión Pulmonar (SHP) , porque esta patología se inicia con los cambios hemodinámicos de vasoconstricción y remodelación vascular de las arteriolas y arterias pulmonares para compensar la hipoxia crónica en los capilares aéreos y/o por las bajas temperaturas ambientales en pollos susceptibles.

La circulación pulmonar se define como un sistema de baja presión y alto flujo, que se caracteriza por presentar una respuesta constrictora potente frente a la hipoxia. El aire disponible para la respiración de los seres vivos tiene una concentración de 21% de Oxígeno; sin embargo, la presión parcial de oxígeno (pO_2) varía según la altura sobre el nivel del mar, a mayor altura menor pO_2; de tal forma que la baja tensión de oxígeno atmosférico, propia de las zonas de gran altitud ejerce diversos efectos en la fisiología cardiopulmonar (Burton y Smith, 1967, Cueva *et al*, 1974; Hernández, 1982; Daneshyar *et al*, 2009). El aire inhalado que respiran las aves criadas en la altura tiene una baja pO_2 que al llegar al pulmón genera hipoxia hipobárica en los capilares aéreos disminuyendo la entrada de O_2 a los capilares sanguíneos y generando hipoxemia, desencadenando unos procesos de homeostasis en la fisiología cardiopulmonar para lograr la compensación del organismo, como son; aumento en la frecuencia respiratoria con el fin de incrementar la entrada de O_2 a los capilares aéreos y además produce vasoconstricción de la vasculatura pulmonar para aumentar y reordenar el flujo sanguíneo hacia las áreas pulmonares más ventiladas y de esta manera exponer más sangre al intercambio gaseoso en la barrera aero-hemática de las zonas donde existe una mejor relación de la ventilación/perfusión; por esta razón la exposición prolongada a hipoxia ambiental puede inducir cambios adaptativos los cuales pueden ser benéficos o dañinos para la supervivencia celular (Dore-Duffy *et al*, 1999). Fisiológicamente sucede lo

anterior como un mecanismo de compensación y adaptación para hacer más eficiente el intercambio gaseoso y aumentar la entrada de O_2 al organismo; sin embargo, cuando el fenómeno es por largo periodo de tiempo en aves susceptibles, a la vasoconstricción se suma el fenómeno de la remodelación vascular con el engrosamiento de la pared de las arteriolas y arterias pulmonares y la muscularización de segmentos vasculares no musculares (Stenmark y Mechan, 1997).

La vasoconstricción y remodelación vascular arterial pulmonar también producen un aumento de la resistencia para el vaciamiento de la sangre del ventrículo derecho, de esta manera se produce como mecanismo compensatorio un aumento de la frecuencia y del gasto cardiaco; cuando estos eventos superan los límites fisiológicos se produce hipertrofia y dilatación del ventrículo derecho, expresado como un aumento del índice cardiaco (IC: resultante de dividir el peso del ventrículo derecho sobre el peso ventricular total (Alexander & Jensen, 1959) que indica una falla cardiaca subclínica que al persistir en el tiempo y en la gravedad del síndrome provocaría una falla cardiaca aguda o crónica e insuficiencia cardiaca congestiva que ocasiona hidropericardio, ascitis e incluso la muerte súbita en las aves susceptibles.

Por otra parte el organismo aumenta los valores de la hemoglobina y del hematocrito (Cárdenas *et al*, 1985) y el recuento de glóbulos rojos por la estimulación de la eritropoyetina renal para hacer más eficiente el transporte de O_2 hacia los tejidos; sin embargo, aumenta la afinidad del O_2 por la hemoglobina pero disminuye la capacidad de disociación del O_2 hacia los tejidos, lo cual podría llevar a estados de isquemia celular o tisular, por ejemplo, en músculo cardiaco y complicar el cuadro de la falla cardiaca.

1.3 El endotelio en la HAP

El endotelio es un tejido complejo compuesto de células altamente especializadas constituyendo una monocapa interna en los vasos sanguíneos, está ubicado en una posición anatómica estratégica entre la sangre circulante y la túnica media donde están las células musculares lisas de la pared vascular; además, las células endoteliales están

orientadas en el sentido del flujo sanguíneo y pueden adaptar su número y disposición según las necesidades locales (López-Jaramillo, 1998); las células endoteliales junto con las células hematopoyéticas evolucionan a partir de los hemangioblastos (Choi *et al*., 1998; Galley y Webster, 2004). Debido a su localización en la pared vascular, el endotelio está expuesto permanentemente a estímulos mecánicos, como la fricción ejercida por el flujo sanguíneo, cambios en la presión sanguínea y en la presión parcial de oxígeno, así como a numerosos estímulos químicos, humorales y celulares; entonces, el endotelio percibe y responde a estas señales con la regulación de la producción de sustancias vasoactivas que van a controlar la presión sanguínea, el tono vasomotor local y el crecimiento vascular. Así, actúa, como un sistema receptor y emisor de señales (Inagami, 1995). Evidencias sugieren que el tono normal de la vasculatura pulmonar y la proliferación celular del músculo liso vascular, se regulan por una compleja interacción de sustancias vasoactivas producidas localmente por el endotelio vascular (Ignarro, 1989). Por todo lo anterior, el endotelio es considerado un autentico órgano que regula el tono vascular local con acciones endocrinas, paracrinas y autocrinas, implicadas en diversos procesos vasoactivos, metabólicos e inmunes (Inagami et al., 1995; Lahera et al., 2003).

Los estudios realizados en arterias pulmonares de cerdos, ratas, perros y con anillos arteriales aislados, en los cuales se removió el endotelio mostraron una disminución significativa de la contracción ante el estímulo hipóxico (Holden & McCall, 1984; Rodman, 1992; Ogawa *et al*, 1993). Estos resultados sugieren que el endotelio desempeña un papel importante en el control del tono vascular y específicamente en la regulación de la contracción como respuesta a la hipoxia. Parece que las células endoteliales de la vasculatura pulmonar juegan un papel central en el control de la respuesta vascular pulmonar y en la patogénesis de la HAP. Durmowicz *et al* (1993), propusieron que la adaptación al medio ambiente de la gran altura ocasiona cambios significativos en la función endotelial; ellos encontraron una notoria diferencia en la morfología de las células endoteliales de las arteriolas pulmonares del Yak, en comparación con las del bovino doméstico y esa morfología estuvo seleccionada tanto con la disminución de la resistencia vascular pulmonar, como con la pérdida de la reactividad a la hipoxia crónica.

1.4 La disfunción endotelial en la HAP

El endotelio normal se caracteriza por ser una capa de células quiescentes o estables; sin embargo, cuando se produce la disfunción endotelial, se altera este balance y el endotelio sintetiza una mayor cantidad de sustancias vasoconstrictoras tales como la ET-1, la serotonina y el tromboxano A_2 (TxA_2) y una menor cantidad de vasodilatadores como el óxido nítrico (NO), la prostaciclina y el factor de hiperpolarización derivado del endotelio (EDHF).

Cuando hay una exposición prolongada a hipoxia hipobárica o a una baja disponibilidad de O_2 se activan las células endoteliales (Dore-Duffy *et al*, 1999), adicionalmente, el estrés hemodinámico que acompaña a la HAP puede generar cambios en la estructura y en la función del endotelio (Mombouli & Vanhoutte, 1999), debido a esto, se genera disfunción endotelial que conlleva a una alteración en el balance de las moléculas vasoactivas pulmonares provocando vasoconstricción pulmonar, proliferación de células musculares lisas de los vasos y trombosis *in situ* característico de la HAP (Coggins & Blotch, 2007).

Los mecanismos responsables de la activación endotelial aún no se conocen; sin embargo, numerosos estímulos incluyendo el estrés de rozamiento por el incremento del flujo sanguíneo pulmonar, las infecciones virales y la hipoxia alveolar o de los capilares respiratorios, pueden activar las células endoteliales en individuos genéticamente susceptibles (Budhiraja *et al,* 2004). La hipoxia crónica es uno de los estímulos más importantes para la activación de las células endoteliales y su consecuente disfunción conlleva al desarrollo de la vasoconstricción y la remodelación estructural de la pared vascular (Pak *et al,* 2007). La vasoconstricción hipóxica y la remodelación del lecho vascular pulmonar son los eventos fisiopatológicos más importantes que determinan el establecimiento de la HAP y el desarrollo posterior de la falla cardiaca derecha (Adnot *et al,* 1991).

La disfunción endotelial también afecta la túnica media vascular, puede generar hipertrofia e hiperplasia de las células musculares lisas y aumento del grosor de la

adventicia, modificaciones que conducen a cambios secundarios en la pared vascular, con lo cual hay un estrechamiento en el lumen y aumento de la resistencia en el flujo vascular; esto se debe a que la ET-1 tiene potencial como mitógeno, mientras que el NO es inhibidor del crecimiento; por lo tanto, el balance entre mitógenos e inhibidores del crecimiento es de vital importancia en el control de la proliferación de las células musculares lisas (Hassoun *et al*, 1989). A pesar de que la regulación génica es diferente de la ET-1 y la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS, por sus siglas en inglés: *Endothelial Nitric Oxide Sintasa*), la activación celular que lleva a la disfunción endotelial está asociada con la respuesta coordinada y recíproca de estos genes, conocida como inducción transcripcional de la ET-1 y desestabilización del mRNA de la eNOS (Mawji y Marsden, 2003).

Adicionalmente, la hipoxia genera un incremento en la inducción transcripcional de genes que codifican sustancias que participan en el proceso de la remodelación vascular como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, PDGF (por sus siglas en Inglés: *Platelet-Derived Growth Factor*), el factor de crecimiento endotelial vascular, VEGF (por sus siglas en Inglés: *Vascular Endothelial Growth Factor*), el factor de crecimiento similar a la insulina, IGF (por sus siglas en Inglés: *Insulin-Like Growth Factor*), la familia de péptidos que actúan como factores de crecimiento de los fibroblastos, FGF (por sus siglas en Inglés: *Fibroblast Growth Factor*), la trombospondina-1, entre otros. Diversos factores median la inducción transcripcional de estos genes en respuesta a la hipoxia, entre los que se destacan la proteína activadora 1, AP-1 (por sus siglas en Inglés: *Activator Protein*-1), el factor nuclear-κB y el factor de transcripción inducido por la hipoxia, HIF-1 (por sus siglas en Inglés: *Hypoxia Inducible Factor 1)* (Faller, 1999).

La regulación del tono vascular en las vías sanguíneas depende del equilibrio de una compleja red de mediadores químicos; dentro de las moléculas vasoconstrictoras están la endotelina 1, el tromboxano A2 (TxA2), la serotonina y en las vasodilatadores el óxido nítrico (NO) y la prostaciclina o prostaglandina I2 (PGI2) entre otros.

La serotonina (5 hidroxitriptamina, 5-HT) está involucrada en la etiología de la HAP como un potente vasoconstrictor, que puede tener un efecto doble en la circulación pulmonar, contribuye a la vasoconstricción aguda inducida por hipoxia y a la remodelación vascular crónica por la activación de estos receptores afines. En respuesta a la hipoxia, 5-HT es

liberada por células neuroendocrinas y cuerpos neuroepiteliales distribuidos a lo largo de las vías aéreas. Además, las células del músculo liso y las células endoteliales aisladas de arterias pulmonares expresan mRNAs para receptores de 5-HT (5-HT 1B, 5-HT 2A, 5-HT 2 y 5-HT 2B) (Launay *et al* 2002). El TxA2 es un metabolito del ácido araquidónico que posee efecto vasoconstrictor, promotor de la remodelación vascular y la proliferación endotelial e inhibidor de la apoptosis (Wideman, 1999). La prostaciclina o prostaglandina I2 es un producto del ácido araquidónico por la vía de la ciclooxigenasa, es un vasodilatador ya que estimula el AMPc, también promueve la agregación plaquetaria, anti-inflamatorio y favorece la apoptosis.

1.5 Endotelina (ET)

La endotelina (ET) es el vasoconstrictor endógeno más potente conocido y tiene una acción fisiológica prolongada, fue descubierto por Yanagisawa *et al* (1988), se aisló del sobrenadante de células endoteliales porcinas, tiene un peso molecular de 2492 Da, posee grupos amino y carboxilo libres en los extremos y dos puentes disulfuro intracadena entre los residuos cys^{1}-cys^{15} y cys^{3}-cys^{11} (Goto *et al*, 1996), además presenta una semejanza marcada en estructura y actividad biológica con las Safaratoxinas, un isopéptido aislado del veneno de la serpiente *Atractapis engaddensis* (Goto *et al*, 1996).

En el análisis del genoma humano se reveló que hay tres isopéptidos de endotelina; ET-1, ET-2, ET-3, cada una codificada por diferentes genes localizados en los cromosomas 6, 1 y 20 respectivamente (Inoue, *et al* 1989). La ET-1 es la única isoforma sintetizada en las células endoteliales, en el epitelio de las vías aéreas, el corazón, el riñón, la pituitaria, el sistema nervioso central y las células musculares lisas; sin embargo, sus concentraciones son extremadamente bajas comparadas con las detectadas en las células endoteliales (Bouallegue *et al,* 2007); la distribución de la ET-2 es restringida a riñón e intestino y la ET-3 se expresa en cerebro, pulmón, intestino y glándula adrenal (López-Jaramillo, 1998).

El gen de la ET-1 humana tiene 5 exones y 4 intrones, con regiones 3`y 5` y aprox. 6.8 Kb de DNA. Cada uno de los 5 exones codifica una porción de pre-endotelina 1. El análisis de secuencia de cDNA de ET-1 reveló la existencia de un gen que codifica para un precursor, Pre-endotelina- 1. La Pre-endotelina-1 en humanos es una proteína de 212 aminoácidos que se separa por proteolisis debido a la acción de una endopeptidasa específica (furina) en las posiciones Lys^{51}-Arg^{52} y Arg^{92}-Arg^{93}. El resultante es un péptido de 38 aminoácidos llamado Gran Endotelina 1, la cual subsecuentemente también es separada en la posición Trp21-Val22 por una endopeptidasa llamada enzima convertidora de endotelina (ECE). Entonces se produce la ET-1 (Inoue *et al*, 1989). El gen de la ET-1 en el humano se encuentra en el cromosoma 6, el mRNA tiene 2117 pb y la proteína está conformada por 212 aminoácidos y tiene un peso molecular de 26 KDa, mientras que en el *Gallus gallus* el gen de la ET-1 se encuentra en el cromosoma 2, el mRNA y la proteína aún continúan en estudio (*GenBank*).

Hay 2 isoformas de receptores de ET: el receptor tipo A de la endotelina (ETA) y el receptor tipo B de la endotelina (ETB); el ETA es específico para ET-1 y ET-2 pero con baja afinidad para ET-3 y se encuentra en tejidos como el corazón, el pulmón, el intestino y principalmente en las células musculares lisas de los vasos sanguíneos donde desarrolla el efecto paracrino de vasoconstricción de la ET-1; mientras que, el ET_B se liga a las 3 ET y está localizado en las células endoteliales, en las células musculares lisas, el cerebro, el pulmón y el riñón; hay 2 tipos de ET_B; (1) ET_B1 con efecto autocrino sobre las mismas células endoteliales de vasodilatación por la acción de la liberación de NO y (2) ET_B2 también con efecto de vasoconstricción en las células musculares lisas por la acción de la ET-1 (Seo *et al*, 1994; Inagami *et al* 1995). Los receptores son miembros de la superfamilia de receptores vinculados con las proteínas de unión al nucleótido guanina o proteínas G. La estructura de los receptores es aproximadamente 50% igual entre ellos y cada tipo es altamente conservado en especies de mamíferos (85-90%) (Levin, 1995). El gen del receptor ETA en el humano se encuentra en el cromosoma 4, el mRNA tiene 4168 pb y la proteína tiene 427 aminoácidos y pesa 69 KDa, mientras que en el *Gallus gallus* el gen se encuentra en el cromosoma 4, el mRNA tiene 2988 pb y la proteína tiene 421 aa.

Los genes que codifican la endotelina son expresados con diferentes patrones en una variedad amplia de tipos celulares como los miocitos cardiacos, las células de la vasculatura muscular lisa, células epiteliales de los túbulos renales, células del mesangio renal, células de glía, células de la pituitaria, macrófagos y células de Mast. Lo anterior, es sugestivo de que los péptidos pueden participar independientemente en mecanismos regulatorios complejos en varios órganos y también tienen efectos pleitrópicos en órganos de los aparatos respiratorio, gastrointestinal, urinario, las glándulas endocrinas, el sistema nervioso central y periférico y se considera que tiene una relación intima con el control fisiológico y fisiopatológico en varios órganos (Inoue *et al,* 1989; Goto *et al*, 1996). Las endotelinas son reguladas por cambios en la expresión genética en respuesta a una amplísima variedad de estímulos físicos (desgarro o tensión) y químicos (hipoxia, endotoxina, trombina, adrenalina, Ang II y citoquinas) (López-Jaramillo, 1998).

La ET-1 endógena modula el tono vascular y el flujo sanguíneo regional como una hormona circulante o ejerce su acción localmente dentro de la pared vascular y en el endotelio de forma autocrina y paracrina (Goto *et al*, 1996). La ET-1 promueve la proliferación de células endoteliales, células musculares lisas y de fibroblastos lo cual puede resultar en cambios estructurales en la pared vascular llevando a la remodelación (Inagami, 1995). La ET-1 ejerce efectos crónicos implicados en la proliferación y la remodelación de los vasos sanguíneos; en varios estudios, la ET-1 ha sido involucrada en el estímulo de la expresión de los proto-oncogenes como *c–fos, c-jun* y *c-myc* (Pribnow *et al*, 1992), el incremento en la incorporación de 3H-timidina dentro del DNA indica que hay proliferación de las células vasculares capilares, fibroblastos y células del músculo liso vascular, en estas últimas células la ET-1 tiene actividad mitógena directa por medio de la inducción en la expresión de mRNA de PDGF y TGF-β; también ET-1 tienen efecto mitógeno sinérgico con factores de crecimiento como PDGF, bFGF (por sus siglas en inglés: *Basic Fibroblast Growth Factor*), EGF (por sus siglas en inglés: *Endothelial Growth Factor*), insulina y Ang II (Goto *et al,* 1996).

La expresión del mRNA de ET-1 en cultivos de células endoteliales es estimulada por numerosos factores, incluyendo, la trombina (Emori *et al*, 1992), el factor de crecimiento transformante beta (TGF-β por sus siglas en inglés: *Transforming Growth Factor β*) (Kurihara *et al*, 1994), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α por sus siglas en inglés:

Tumor Necrosis Factor α)(Marsden & Brenner, 1992), Interleukina 1 (IL-1), la Insulina, la Ang II, la vasopresina, los esteres de forbol y la epinefrina (Inagami, 1995).

El incremento de la expresión de ET-1 mRNA inducido por trombina, Ang II, y vasopresina se ha demostrado que es promovido por un incremento en el Calcio (CA^{2+}) intracelular y la activación de la proteína Quinasa C (PKC) por medio de la proteína ligante GTP como consecuencia de la estimulación de sus receptores. Las endotelinas también afectan la vía de la adenil ciclasa; ETA estimula marcadamente la adenil ciclasa probablemente por la vía de la proteína GS, mientras ET_B está acoplada negativamente a la adenil ciclasa probablemente vía proteína GI (Inagami, 1995).

Por otra parte, la expresión del mRNA de ET-1 en cultivos de células endoteliales es inhibido por el óxido nítrico, la prostaciclina, el péptido natriurético auricular (PNA) (Inagami, 1995). El PNA posiblemente activa la guanilato ciclasa A, produce cGMP, y activa proteína quinasa G; este cGMP suprime la formación de inositol trifosfato, lo cual resulta en la inhibición de la expresión del gen de prepo-ET-1, en células endoteliales de ratas (Emori *et al*, 1993; Inoue, 1996); entonces, la vasorelajación producida por el PNA sería por el efecto supresor de la producción de ET-1. El NO inhibe la producción de ET por la vía de los mecanismos del cGMP a través de la activación de guanilato ciclasa (Boulanger *et al*, 1990). PGI_2 produce cAMP por medio de la activación de adenil-ciclasa e inhibe la producción de ET-1. La heparina también disminuye la expresión de mRNA de ET-1 por la inhibición de la vía de PKC (Imai *et al*, 1992).

Una vez la ET-1 se une a su receptor ETA, se activan varias vías de transducción de la señal, las cuales están asociadas con la hipertrofia, la migración y la proliferación de las células musculares lisas vasculares, los cardiomiocitos y las células mesangiales del riñón (Bouallegue *et al,* 2007).

La unión de la ET-1 a su receptor ETA activa las proteínas G, entre las cuales la Gq es la que mejor traduce la señal generada por el receptor ETA. La proteína Gq se caracteriza por tener tres subunidades designadas como (α (αq), β, γ) las cuales están asociadas con la membrana celular. En la forma inactiva del heterodimero Gq, la subunidad αq se encuentra ligada a la guanosina difosfato (GDP). En la forma activa el GDP cambia a

guanosina trifosfato (GTP), la cual inicia la disociación del complejo αq (GTP) y las subunidades β-γ asociadas con la membrana (Pierce *et al*, 2002), su disociación conduce a la activación de la fosfolipasa C tipo β específica al fosfoinositol (PLC β), la cual hidroliza en la membrana lipídica al fosfatidilinositol 4-5 bifosfato (PtdIns $(4,5)P_2$) en dos segundos mensajeros: el diacilglicerol (DAG) el cual es hidrofóbico y permanece en la membrana celular y el inositol 1-4-5 trifosfato $(Ins(1,4,5)P_3)$ de tipo soluble (Fukami, 2002). El $Ins(1,4,5)P_3$ se difunde a través del citoplasma y activa los canales de $Calcio^{2+}$ del retículo sarcoplásmico. La activación de los canales de $Calcio^{2+}$ genera un incremento del calcio en el citoplasma y por ende estimula la contracción del musculo liso vascular. El DAG junto con el calcio activan la proteína Quinasa dependiente de la fosfatidilsecina o proteína Quinasa C, PKC, la cual media la actividad mitógena de la ET-1 (por sus siglas en inglés: *Protein Kinase C*)(Simonson *et al*, 1993; Bouallegue *et al,* 2007). La actividad de la PKC mediada por la ET-1, modula la proliferación y la contracción de las células musculares lisas; de esta forma, la ET-1 induce la activación de la PKC, que junto con sus efectores intracelulares son de gran importancia para la regulación del tono vascular local (Bouallegue *et al,* 2007).

Las elevaciones del Ca^{2+} nuclear y citoplasmático incrementan la unión del factor de transcripción de la proteína activadora 1, AP-1 (por sus siglas en inglés: *Activator Protein-1)*. El incremento de la actividad de unión de AP-1, potencialmente estimula la síntesis de vasoconstrictores y mitógenos derivados del endotelio pulmonar, debido a que los sitios de unión de la AP-1 están presentes en la región promotora de la mayoría de los genes involucrados en la proliferación de las células musculares lisas. Algunos de estos genes son el PDGF, la ET-1 y el VEGF, los cuales estimulan la contracción y la proliferación de las células musculares lisas de la arteria pulmonar a través de la unión paracrina a sus receptores presentes en dichas células (Mauban *et al,* 2005).

En las células musculares lisas vasculares, el PNA y NO disminuyen el tono vascular por la vía de cGMP y la guanilato ciclasa, mientras la ET incrementa el tono vascular por la vía de la Ca^{2+}- calmodulina y las proteínas quinasas. La estimulación autocrina de las células endoteliales con ET-1 puede resultar en la liberación de NO y contribuir a la vasodilatación.

Varios estudios clínicos en humanos sugieren el papel de la ET plasmática en la fisiopatología de arterioesclerosis (Lerman *et al*, 1991) y en la hipertensión inducida por ciclosporina (Mihatsch *et al*, 1988); pero, concluyeron que los niveles plasmáticos de ET no reflejan la producción local de ET porque la mayoría de la ET es secretada y utilizada en la vasculatura circundante. En condiciones patológicas como HAP donde hay una producción y liberación desbalanceada de sustancias vasoactivas el efecto vasoconstrictor de la ET-1 domina sobre el efecto vasodilatador (Inagami, 1995).

1.6 Óxido Nítrico (NO)

El NO es un radical libre en estado gaseoso, inicialmente llamado factor relajante derivado del endotelio, EDRF (por sus siglas en inglés: *Endothelium Derived Reading Factor*), reportado por Furchgott & Zawadzki (1980) quienes postularon que la vasodilatación es dependiente del endotelio y está involucrada en la regulación del tono del musculo liso vascular porque estimularon células endoteliales con acetilcolina (Ach) y con bradiquinina causaron relajación de las células musculares lisas y detectaron un factor de corta vida que llamaron EDRF; Moncada *et al* (1991) reportaron que el EDRF era el mismo NO. La vida media de NO es mínima, incluye pocos segundos (0,1-5 s); éste se inactiva al contacto con el oxígeno, la hemoglobina (Hb) y por reductores semejantes al azul de metileno porque inhibe la guanilato ciclasa soluble; así mismo, su acción es potencializada por la superóxido dismutasa, una enzima limpiadora de radicales libres (Inagami, 1995).

El NO es generado por la sintasa de óxido nítrico, NOS (por sus siglas en inglés: *Nitric Oxide Sintasa*), por medio de la oxidación de uno de los átomos nitrógeno guanidino de la L-Arginina (L-Arg) transformándola en L-Citrulina y NO (Ignarro, 1989, Ignarro 1990; Moncada *et al,* 1991; Moncada y Higgs, 1993; Inagami *et al*, 1995). El NO inhibe la mitogénesis y proliferación de las células musculares lisas vasculares, entonces el NO derivado de las células endoteliales puede regular el tono y la remodelación estructural de la pared vascular (Vanhoutte, 1997); por esta razón el NO derivado del endotelio induce relajación del musculo liso vascular y en sinergismo con la prostaciclina reducen

la tendencia de las plaquetas y otros componentes sanguíneos a adherirse a las células endoteliales; entonces el NO inhibe la agregación plaquetaria; sin embargo, la funciones del NO son limitadas a una pequeña área circundante al sitio de su producción porque es rápidamente inactivado por la hemoglobina (Vanhoutte, 1997).

La sintasas de óxido nítrico (NOS) son un grupo de isoenzimas citosólicas o ligadas a la membrana celular conservadas evolutivamente debido a que se han encontrado en animales mamíferos y no mamíferos incluyendo las aves, protozoos e insectos, así como también en plantas (Bodgan *et al*, 2001), además la NOS tiene 3 isoformas que son diferenciadas según su sitio de expresión y por la regulación de su actividad (Coggins & Blotch, 2007); el DNA complementario de las tres enzimas proviene de diferentes genes (Inagami, 1995). Las tres isoformas son enzimas homodiméricas (Bodgan *et al*, 2001) y comparten una estructura molecular primaria idéntica; consistente de una secuencia dominante citocromo P450 ligado al Hemo en la porción N terminal, una calmodulina ligada en la porción media y secuencias de unión a cofactores en la porción C terminal; además hay una secuencia de fosforilación por la proteína quinasa dependiente del AMP cíclico en la porción N terminal de eNOS (Inagami et al, 1995).

En la reacción enzimática el grupo de NOS requiere de algunos cosubstratos como el oxígeno molecular y la nicotinamida adenina dinucleotido fosfato (NADPH); así mismo, unos cofactores como la flavina adenina dinucleotido (FAD), la flavina mononucleotido (FMN), la tetrahidrobiopterina, grupo hemo, Ca^{2+}/calmodulina y posiblemente también iones de Zinc $^{2+}$ (Bodgan *et al*, 2001).

La familia de la NOS está compuesta por 3 isoformas que se diferencian con respecto al modo principal de regulación, sus funciones claves, la cantidad promedio de NO producido y el patrón de expresión tisular *in vivo* y son las siguientes:

(1) Sintasa de óxido nítrico cerebral (nNOS, por sus siglas en inglés: *Neuronal Nitric Oxide Sintasa*) o NOS1, en humanos el gen se encuentra en el cromosoma 12 y ocupa cerca de 150 Kb de DNA y la traducción genera una proteína de 150 kDa (Inagami *et al*, 1995). La bNOS en estudios inmunohistoquímicos se ha encontrado en tejido neuronal (cerebro, cerebelo, pituitaria posterior y medula adrenal) y en la

mácula densa del aparato yustaglomerular, además en ganglios y fibras nerviosas no adrenérgicas y no colinérgicas localizadas en tracto gastrointestinal, tejido perivascular, células musculares lisas y el sistema de conducción del corazón. El NO derivado de bNOS en el sistema nervioso central y fibras nerviosas no colinérgicas y no adrenérgicas puede servir como un neurotransmisor (Inagami *et al*, 1995).

(2) Sintasa de óxido nítrico inducida (iNOS, por sus siglas en inglés: *Inducible Nitric Oxide Sintasa*) o NOS 2, en humanos el gen que codifica iNOS se encuentra en el cromosoma 17 y la proteína tiene una masa molecular de 125 a 135 kDa (López-Jaramillo, 1998), La iNOS es inducible en macrófagos, leucocitos, polimorfonucleares, células del mesangio renal, fibroblastos, células musculares lisas, células JG, células endoteliales, así como en hígado, pulmón y bazo. En ellas, el NO está relacionado con citotoxicidad tumoral, microbiostasis, inhibición del crecimiento y/o injuria de varias células incluyendo las de la pared vascular y su expresión podría relacionarse con la exposición a endotoxinas o citoquinas inflamatorias. Un exceso en la liberación de NO, principalmente por iNOS, puede inducir condiciones patológicas como es el shock séptico, donde los lipopolisacáridos (LPS) de las bacterias anaerobias inducen iNOS en las células musculares lisas, los macrófagos y células endoteliales lo que ocasiona una hipotensión severa (Inagami *et al*, 1995).

(3) Sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS o NOS3), en humanos el gen se encuentra en el cromosoma 7 en la región 7q35 a 7q36, el gen ocupa alrededor de 21kb de DNA, contienen 26 exones de codifican un mRNA de 4052 nucleótidos, el mRNA de la eNOS tiene un tamaño de 4,7 Kb y la proteína formada contiene 1023 aminoácidos, la enzima eNOS tiene un peso molecular de 135 kDa (López-Jaramillo, 1998) y en bovinos de 144 kDa (Janssens *et al*, 1992), mientras que en el *Gallus gallus* todavía se encuentra en investigación, pero hay un gen similar a eNOS que se encuentra en el cromosoma 1 y el mRNA parcial tiene 413 pb y traduce a una proteína de 138 aa; eNOS es expresada en las células endoteliales de todo el cuerpo y es la fuente predominante de NO en la circulación pulmonar (Coggins & Blotch, 2007); La actividad de eNOS se incrementa en segundos como respuesta a la activación de receptores de superficie celular específicos con varias sustancias

vasoactivas como Ach, bradikinina, Ang II, vasopresina, histamina, norepinefrina, serotonina, endotelina, trombina y estrés de rozamiento.

La secuencia de aminoácidos de las NOS demuestra una igualdad entre ellas del 50-60% (Inagami, 1995). La expresión de eNOS y de bNOS es regulado por el influjo de calcio citosólico y por la presencia de calmodulina, mientras que la iNOS es calcio y calmodulina independiente y produce mayores cantidades de NO por un tiempo mayor (Inagami, 1995).

La administración de inhibidores de NOS conlleva a un rápido incremento de la presión sanguínea (Vanhoutte, 1997), lo cual indica que la secreción sostenida de NO a partir de eNOS regula el flujo y la presión sanguínea, de esta manera la activación de eNOS juega un papel importante en la vasorelajación dependiente del endotelio asociada con sustancias vasoactivas y que el efecto de los inhibidores de NOS cómo (L-NMNA) es debido a la supresión del efecto vasodilatador directo del NO.

La regulación de la transcripción génica del NO es una respuesta a señales extracelulares del músculo liso vascular y se inicia por acción de moléculas receptoras y mediada por un amplio espectro de señales intracelulares. Numerosas interacciones entre el NO y componentes de esas vías han sido demostradas pero el sitio primario de acción del NO y las modificaciones moleculares han sido poco identificados. Ejemplos de blancos del NO incluyen a canales de iones, proteína G (ej. p21*ras*), proteína quinasas tirosina (ej. *proline-rich tyrosine kinase 2*), Quinasas Janus (Jak 1, Jak2, Jak3, Tyk2), proteínas quinasas mitógeno-activado [ej. Erk, p38 MAPK, *c-Jun NH2-terminal kinases (JNK)*], caspasas (ej. caspasa-1, caspasa-3), metaloproteasas y proteínas fosfatasas (ej. Fosfatasa fosfotirosina del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas) (Bodgan, 2001).

Los factores de transcripción implicados en la producción de NO son, el factor nuclear kB, NF kB (por sus siglas en inglés *Nuclear factor-κB*), la proteína activadora 1(AP)-1, (por sus siglas en inglés *Activating protein 1*), y los factores de transcripción finger ZINC que incluyen a Sp1por sus siglas en inglés, *tumor-suppressor protein p53*; Egr-1, por sus siglas en inglés *early growth response 1*; VDR, por siglas en inglés *1α,25-*

dihydroxyvitamin D3 receptor y RXR por sus siglas en inglés *retinoid X receptor*. También se incluye el HIF-1 (por sus siglas en inglés, *hipoxia inducible factor-1*), el cual es un importante regulador de la transcripción del VEGF (por sus siglas en inglés, *Vascular endothelial growth factor*) involucrado en la angiogénesis y de la eritropoyetina (Epo) implicada en el desarrollo de eritrocitos (Bodgan, 2001). La actividad transcripcional del HIF-1 se incrementa exponencialmente cuando la concentración de oxígeno en las células es baja (Semenza, 1999).Bajo condiciones de hipoxia los niveles de HIF-1, la actividad del promotor de VEGF y la expresión del mRNA de la Epo son sobrereguladas en varias líneas de células humanas (Semenza, 1999).

El NO se difunde de su sitio de producción en la célula endotelial hacia las células del músculo liso vascular, donde va activar la guanilato ciclasa soluble (sGC) porque reacciona el NO con el hierro ferroso en el grupo prostético Hem de la sGC , una vez la sGC esta activa aumenta la producción de cGMP (por sus sigla es inglés: *Cyclic Guanosine Monophosphate*) a partir de GTP (por sus siglas en inglés: *Guanosine Triphosphate)* dentro de las células musculares lisas incrementando la concentración de cGMP y llevando consecuentemente a relajación vascular (Adnot & Ralfestir, 1996; Dinh-Xuan, 1993). El efecto del cGMP es mediado a través de la activación de sus proteínas efectoras; las proteínas kinasas dependientes de cGMP (PKG), los canales iónicos abiertos de cGMP y las fosfodiesterasas (PDEs), como la fosfodiesterasa 5 (PDE5) es específica para cGMP y es el blanco donde actúan fármacos como el sildenafil que inhibe la PDE5 y bloquea el traspaso de cGMP a GTP y de esta manera favoreciendo la dilatación vascular por el mantenimiento de una concentración de cGMP dentro de las células musculares lisas.

El cGMP dilata las células musculares lisas por muchos mecanismos intracelulares dependientes del cGMP que incluyen: la hiperpolarización de la membrana celular y la inhibición de flujo de calcio; también disminuye la sensibilidad de los miofilamentos de calcio por la activación de la fosfatasa de la cadena liviana de miosina por vía de la fosforilación mediada por PKG (Coggins & Blotch, 2007).

Después de la unión del agonista con los receptores proteína G específicos, ellos activan la fosfolipasa C para producir inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol, de esta forma se aumenta las concentraciones de Ca^{+2} citosólico y entonces se activa la calmodulina, lo cual resulta en activación de eNOS; por otra parte la actividad de eNOS es atenuada por intermedio de la fosforilación de la proteína quinasa A y de esta manera, se mantiene el balance de entre la producción de NO y ET-1. La Ach produce vasorelajación normal en arterias ateroescleróticas sin un incremento significativo del GMP cíclico, soportando la hipótesis de que el endotelio produce factor de hiperpolarización derivado del endotelio (EDHF) (Inagami, 1995).

Existe otro mecanismo por el cual el NO induce vasodilatación directamente sin utilizar al GMP cíclico como segundo mensajero y es a través de su acción sobre los canales de K^+ de pendientes del Ca^{2+}; el NO abre los canales de K^+ causando la hiperpolarización de la membrana celular, la cual cierra los canales de Ca^{2+}, e impide la entrada de Ca^{2+} al citoplasma de la célula muscular lisa vascular y causa vasorelajación.

Hay otras vías de acción alternativas del NO, como son la oxidación del NO a nitrato o reacciones del NO con proteínas que tengan el grupo tiol para formar *S-Nitrosothiols* (SNOs), estos han sido relacionados en interacción con la Hemoglobina (Hb) de los glóbulos rojos, por lo cual podrían aprovechar la naturaleza alostérica de la Hb transportando la señal del NO hacia la periferia, donde este vasodilatador potencial permite la liberación selectiva de sangre oxigenada al tejido hipóxico, lo cual permite sugerir que los SNOs, unos derivados estables del NO, tienen propiedades vasodilatadoras (Coggins & Blotch, 2007). McMahon *et al* (2005), demostraron que el aumento del contenido de SON-Hb contenido en eritrocitos causa una reducción en la resistencia pulmonar vascular e incrementa la PO_2 arterial, lo que permite suponer que el papel vasodilatador de los eritrocitos modera la vasoconstricción pulmonar hipóxica y puede mejorar la relación ventilación-perfusión (V/Q). El NO producido en el pulmón también puede tener efectos sistémicos por la vía de los nitritos. La Hb desoxigenada posee una actividad nitrato reductasa, con la hipótesis que los nitritos en el plasma y dentro de los eritrocitos son reducidos a NO en la vasculatura periférica, formando Hb (FeNO) y conlleva subsecuentemente a la liberación de NO de los eritrocitos para generar vasodilatación de la microvasculatura (Coggins & Blotch, 2007).

La significancia fisiopatológica del NO en la enfermedad cardiovascular presenta 2 aspectos; la deficiencia de NO derivado de eNOS y el exceso de NO derivado de iNOS. La disminución en la producción de NO en condiciones basales o estimuladas es uno de los principales factores de la hipertensión; los mecanismos postulados para la deficiencia de NO serian la falta de L-Arg como sustrato, un defecto en las señales del sistema de traducción en las células endoteliales, una acelerada degradación del NO por el anión superóxido y una deficiencia o ausencia de la eNOS (Inagami, 1995).

Konishi & Su (1983) fueron los primeros en reportar que la relajación derivada del endotelio es reducida en arterias de ratas espontáneamente hipertensas. Se localizó eNOS e iNOS en tejido pulmonar humano y de ratas enfermas mediante inmunoperoxidasa y por histoquímica por la demostración de la actividad NADPH diaforasa de NOS, se encontró que los individuos con HAP tienen una menor cantidad de eNOS (Kobzik *et al*, 1993).

Moreno & Hernández (2003) a través de la histoquímica por la demostración de la actividad NADPH diaforasa de la NOS demostraron que la eNOS se expresa en mayor proporción en las arteriolas pulmonares de los pollos de engorde sanos, en comparación con los que desarrollan hipertensión pulmonar y estudios previos han demostrado que la eNOS, la enzima del aminoácido L-arginina a óxido nítrico (NO) y L-citrulina, se expresa en mayor proporción en las arteriolas pulmonares de los pollos de engorde sanos comparados con los que desarrollan HAP. Así mismo, la expresión génica de la ET-1, el receptor ETA, el Factor de Crecimiento del Tejido Conectivo (CTGF, por sus siglas en inglés *Connective Tissue Growth Factor*), el PDGF y la Adrenomedulina están aumentadas en pollos enfermos con HAP en comparación con los sanos (Gómez *et al*., 2007); esta menor expresión génica de la eNOS y mayor expresión de la ET-1 en los pollos enfermos, causa un efecto vasoconstrictor en la circulación arterial pulmonar y estimula la mitosis de las células musculares lisas. Por lo tanto, el incremento de la susceptibilidad a la hipertensión pulmonar observado en pollos de engorde expuestos a la hipoxia hipobárica, puede estar relacionado con la reducción en la capacidad de relajación de la circulación pulmonar por la disminución de la actividad de la eNOS y por consiguiente por una disminución de la liberación de NO. Sin embargo, aún no se conoce

el patrón de expresión de las proteínas traducidas de dichos genes en pollos de engorde sanos y con HAP de origen hipóxico.

2 Efecto de la exposición a la hipoxia hipobárica sobre la presentación de Hipertensión Arterial Pulmonar en pollos de engorde

2.1 Resumen

La Hipertensión Arterial Pulmonar (HAP) inducida por la hipoxia hipobárica genera grandes pérdidas económicas en la industria de la carne de pollo. En las aves con susceptibilidad genética a la HAP para compensar la hipoxia crónica en los capilares aéreos hay contracción y remodelación de las arterias y arteriolas pulmonares, aumento del gasto cardiaco, de la masa muscular del ventrículo derecho (índice cardiaco-IC), congestión pasiva en la circulación de retorno, ascitis, hidropericardio y las aves afectadas mueren por falla cardiaca. Se criaron pollos de engorde de una estirpe comercial a 2638 m.s.n.m. y a 310 m.s.n.m. y se determinó el efecto de exposición a la hipoxia hipobárica sobre la incidencia de HAP y la mortalidad de las aves.

La altura sobre el nivel de mar tiene un efecto directo sobre la salud de los pollos de engorde, en las aves mantenidas bajo condiciones de hipoxia hipobárica la mortalidad acumulada al día 42 de edad en machos fue del 35,2% y en hembras del 53,8%. La HAP fue la responsable del 90,6% de la mortalidad total en los machos y en las hembras del 96,4%. En los pollos criados a 2638 m.s.n.m. y sacrificados al día 33 el 64% desarrolló HAP (IC>25), el 32% presentó ascitis y el 82% evidenció hidropericardio, se demostró que la ascitis sólo es un signo de HAP y puede no encontrarse en la fase aguda de la enfermedad y el hidropericardio es un hallazgo a la necropsia característico de la presencia de HAP. Los pollos mantenidos en normoxia relativa tuvieron una mortalidad acumulada del 1%; no presentaron lesiones compatibles con HAP y el índice cardiaco (IC) fue entre 14,8 y 20,5.

El tiempo de exposición a la hipoxia hipobárica no influye sobre la forma de presentación y no afecta la manifestación de la enfermedad y la susceptibilidad a la muerte por causa de HAP se debe a un factor individual de adaptación. No hubo ninguna relación entre el IC y la edad de muerte espontánea (r=0,026).

Palabras clave: Hipoxia, Hipertensión arterial pulmonar, pollos de engorde, índice cardiaco, ascitis, hidropericardio.

2.2 Introducción:

La Hipertensión Arterial Pulmonar (HAP) es una enfermedad que afecta a los pollos de engorde y se caracteriza por los cambios de vasoconstricción aumentada más allá de los límites fisiológicos compensatorios y de remodelación vascular de las arteriolas y las arterias pulmonares para compensar la hipoxia crónica en los capilares aéreos y/o por las bajas temperaturas ambientales.

La enfermedad ha recibido varios nombres como; “Edema Aviar”, “Ascitis Aviar”, “Síndrome Ascítico del Pollo”, “Ascitis secundaria a insuficiencia cardiaca”, generalmente por su signo clínico más común, la ascitis, pero este signo se presenta en múltiples patologías, una de ellas y la más importante es la HAP, por esa razón el nombre más apropiado para esta enfermedad es Hipertensión Arterial Pulmonar (HAP) o Síndrome de Hipertensión Pulmonar (SHP).

La HAP en pollos de engorde es un problema económico serio; Maxwell y Robertson (1997), reportaron la presentación de HAP en 18 países de 4 continentes y afecta al 4,7% de los pollos del todo el mundo. Guo *et al* (2007), plantearon que la HAP era responsable del 25% de la mortalidad total en los lotes de pollos de engorde. Arce (1998), afirmó que para 1995, el 70% del total de las explotaciones de pollo de engorde de México, es decir unos 630 millones de aves se localizaban en zonas altas y que se reportaba una mortalidad de 3% a causa de la enfermedad. En Estados Unidos, se registraron mortalidades en las aves del 2 a 5%, con pérdidas de alrededor de los 100 millones de dólares anuales (Bottje *et al*. 1995). En Canadá se estimó en el 2004 que la

mortalidad debida a HAP en la industria de pollo mundial generó pérdidas del orden de $ 500 billones de dólares por año (Agriculture and Agri-Food, Canada, 2004; Chicken Farmers of Canada 2004.).

La causa de este síndrome es la hipoxia, debida a la baja tensión de oxígeno atmosférico (Burton *et al*, 1967). Los pollos de engorde son muy sensibles a desarrollar HAP por la hipoxia hipobárica. La HAP se presenta principalmente en las explotaciones comerciales situadas a una altura superior a los 1300 m.s.n.m. (Marín, 1980; Arce, 1998). La temperatura ambiental también es un factor desencadenante de HAP en pollos de engorde susceptibles (Renjifo, 1979; Hernández, 1984; Pan *et al,* 2005; Daneshyar *et al*, 2009). Gonzales *et al* (1998) en un experimento realizado en Brasil durante el invierno, reportaron una mortalidad acumulada entre el 5,1 y el 12,96% a los 42 días en algunas estirpes de pollos de engorde de rápido crecimiento (Cobb, Ross, Arbor Acres, Hubbard); mientras que en pollos *Label Rouge* (Cuello desnudo, aves nativas) fue del 1,85%, y que más del 50% de esta mortalidad fue consecuencia de HAP.

El síndrome de HAP se puede presentar en cualquier edad, pero hay mayor ocurrencia en la tercera y cuarta semanas (Hernández, 1982; López, 1982; Moreno & Hernández, 1996). El porcentaje de mortalidad por HAP es variable; en Colombia se reportó del 8% (Hernández, 1982), en México hasta del 35% (López, 1982). En 1994, varios autores reportaron una mortalidad acumulada de entre 15 a 35.6% (Anthony *et al*, 1994; Balog *et al*, 1994). En estudios más recientes Guzmán *et al* (2001), realizó experimentos en dos estirpes comerciales de pollos de engorde alojadas a 2638 m.s.n.m., por una parte con control de temperatura y encontró un porcentaje de mortalidad de 17.08% y 15.37%. Igualmente, evaluó los dos grupos en las mismas condiciones pero sin control de la temperatura y observó un incremento en la mortalidad de 23.87% y 26.12% respectivamente. Areiza *et al* (2011) informaron en un grupo de machos de la estirpe Cobb criados a 2638 m.s.n.m. al día 24 de edad, una mortalidad total del 11,73% de la cual el 9,18% estuvo asociada con HAP. Así mismo, Vásquez y Hernández (2012), en investigaciones con pollos de engorde de la estirpe Cobb 500 encontraron que todos los grupos evaluados presentaron alta mortalidad a causa de HAP, en un rango entre 18.92% y 38.8%,

Se ha discutido una aparente diferencia de susceptibilidad a desarrollar el síndrome de HAP. Sillau & Montalvo (1982), reportaron una adaptación genética en pollos de engorde, después de la exposición por varias generaciones a ambientes de altitud. Hernández (1982), manifestó que la altura sobre el nivel del mar es el factor más importante para la presentación de HAP, después de evaluar variables como la influencia de la raza, el sexo, el nivel energético de la ración alimenticia. Huchzemeyer *et al,* (1988) encontraron diferencias en la susceptibilidad a la hipoxia en diferentes estirpes comerciales de pollo de engorde, la cual solamente puede ser explicada como de origen genético. Moreno & Hernández (1985) compararon la respuesta a condiciones de hipoxia crónica de la estirpe comercial Arbor Acres con la de pollos criollos nacidos y criados en altura (2638 m.s.n.m.) y encontraron que los pollos criollos no desarrollaron HAP, gracias a un proceso adaptativo por su permanencia prolongada en las grandes alturas y la adaptación ha sido trasmitida en las generaciones sucesivas. Zhang *et al,* (2007) concluyeron que la adaptación en los pollos tibetanos se ha logrado gracias a un incremento en la afinidad de los glóbulos rojos por el oxígeno en la reducción de la susceptibilidad a la hipocapnia, entre otros.

El presente trabajo busca determinar el efecto del tiempo de la exposición a hipoxia hipobárica sobre la incidencia de HAP en una estirpe comercial de pollos de engorde, así como, establecer la relación entra la mortalidad por HAP y la ganancia de peso semanal, comprobar la relación entre el IC de pollos afectados y la edad de mortalidad espontánea y establecer la tasa de mortalidad según el sexo.

2.3 Materiales y Métodos:

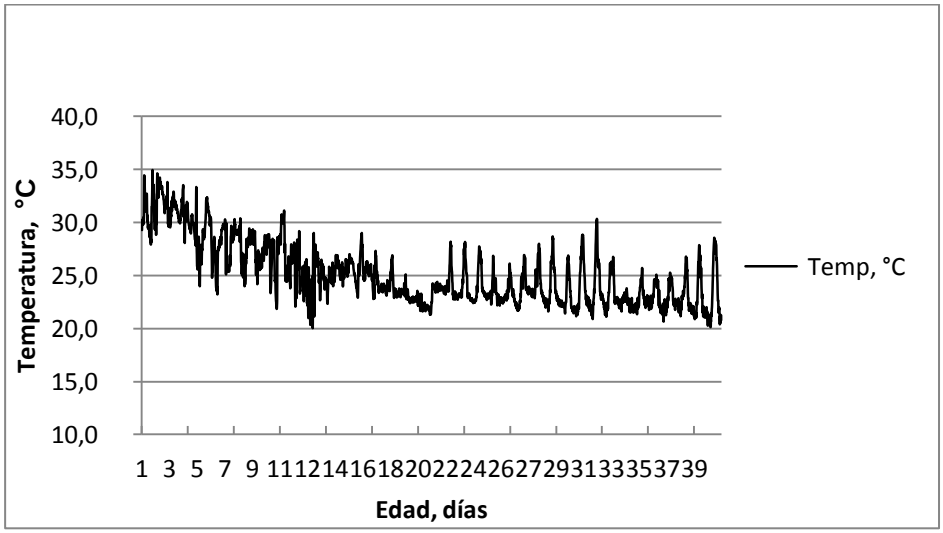
Se utilizaron 350 pollos de engorde, 106 hembras y 245 machos escogidos al azar de la estirpe genética comercial Cobb 500, procedentes de la misma planta de incubación ubicada a 300 m.s.n.m. Todas las aves se mantuvieron bajo condiciones normales de producción, la alimentación fue según la recomendación de las tablas de consumo de la estirpe comercial; en el lote 1 se garantizó que la temperatura fuera superior a los 20°C

(Ver Figura 2-1.); mientras que, en el lote 2 la temperatura promedio fue de 27 °C. Los pollos fueron divididos aleatoriamente de la siguiente manera:

Lote 1: 250 pollos, 106 hembras y 145 machos mantenidos bajo condiciones de hipoxia hipobárica natural a 2638 m.s.n.m. (presión barométrica, PB: 560 mmHg; presión parcial de oxigeno, PO_2: 117 mmHg; PO_2 inspirado: 105 mmHg). Edificio Avícola de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia (Bogotá, Colombia).

Lote 2: 100 machos bajo normoxia relativa a 310 m.s.n.m. (PB: 749 mmHg; PO_2: 153 mmHg; PO_2 inspirado: 141 mmHg). Granja experimental (Nilo, Colombia).

Figura 2-1. Temperatura ambiental expresada en grados Celsius (°C) del galpón a 2638 m.s.n.m.



A las aves se les realizó la eutanasia a los 33 días de edad, mediante dislocación cervical, un método físico que produce una depresión directa del sistema nerviosa central y es aprobada por la Asociación Americana de Médicos Veterinarios (JAVMA, 2001; por sus siglas en ingles *American Veterinary Medical Association*). Acto seguido se les hizo una necropsia, el criterio para incluir las aves en el experimento fue que los animales no evidenciaran sintomatología compatible con otras patologías diferentes a HAP.

Con el objetivo de evaluar la presentación de HAP en cada lote se calculó el IC en fresco, según lo establecido por Alexander & Jensen, 1959, (peso del ventrículo derecho (PVD)

dividido por el peso de la masa ventricular total (MVT) multiplicado por 100). Teniendo en cuenta el índice cardiaco, las aves se clasificaron de la siguiente forma:

Pollos de engorde sanos: con índice cardiaco inferior a 25%

Pollos de engorde con hipertensión pulmonar: con índice cardiaco superior a 26% (Areiza *et al*, 2011; Vásquez y Hernández, 2012).

De esta manera, se obtuvieron 3 grupos experimentales según la altura sobre el nivel del mar de crianza y la presentación de HAP, ver tabla 2-1.

Tabla 2-1. Grupos experimentales según la altura sobre el nivel del mar de crianza y la presentación de HAP.

	Lote 1 - Zona alta Hipoxia Hipobárica		**Lote 2 - Zona Baja Normoxia relativa***
Número de Aves	**250**		**100**
Grupo experimental	A	B	C
Índice cardiaco-IC	>26	<25	<25

A. Aves expuestas a hipoxia hipobárica (altura) enfermas.
B. Aves expuestas a hipoxia hipobárica (altura) sanas.
C. Aves expuestas a normoxia relativa (baja altitud) sanas.
*En el grupo de aves expuestas a normoxia relativa en baja altitud no hubo mortalidad, ni aves enfermas con HAP.

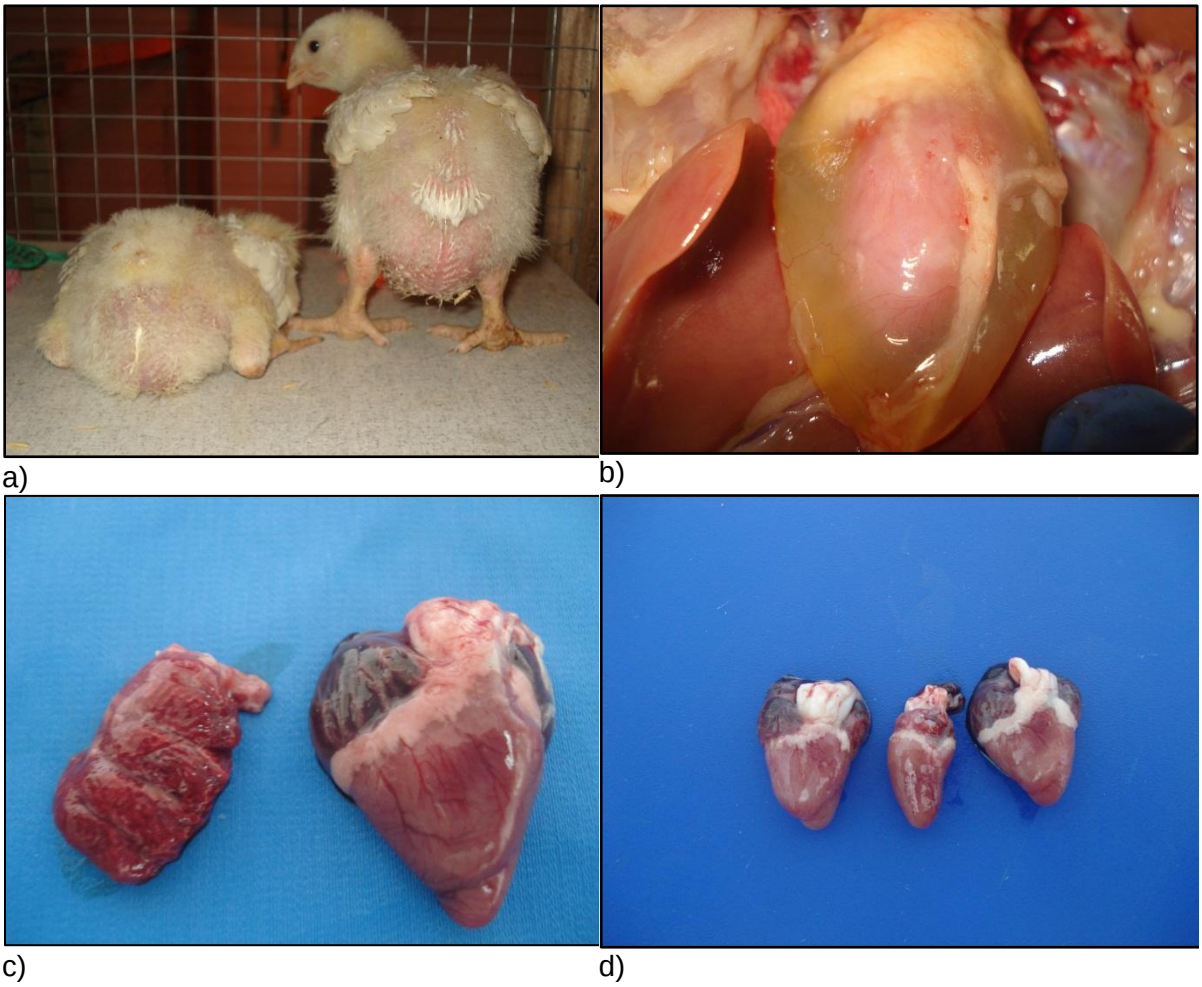
La hipótesis nula fue que los resultados de los hallazgos a la necropsia, el IC, la histología pulmonar , el peso de las aves y la mortalidad fueron iguales en los grupos experimentales y una hipótesis alterna en la que al menos un tratamiento tiene resultados diferentes. El análisis se realizó mediante un modelo completamente al azar y se demostró que se cumplieron con los supuestos de homogeneidad del material experimental, también que el error experimental es una variable aleatoria independiente con distribución normal, media cero y homogeneidad de varianzas; cuando no se cumplió la homogeneidad de varianzas se realizó ANOVA con la prueba de Welch, la cual es robusta a la heterogeneidad de varianzas; cuando la prueba F o Welch resultó ser significativa se hizo una comparación múltiple de medias de Scheffe, que también es

robusta a homogeneidad o heterogeneidad de varianzas. Igualmente se llevaron a cabo pruebas de correlación de Pearson para ver el grado de asociación entre las variables cuantitativas (Kutner *et al*, 2005). Para declarar diferencias estadísticas, el nivel de significancia tuvo que ser menor de 0.01 ($P < 0.01$). El análisis de los datos se hizo con el *IBM®SPSS®predictiveanalytics software and solutions*, versión 17.

2.4 Resultados:

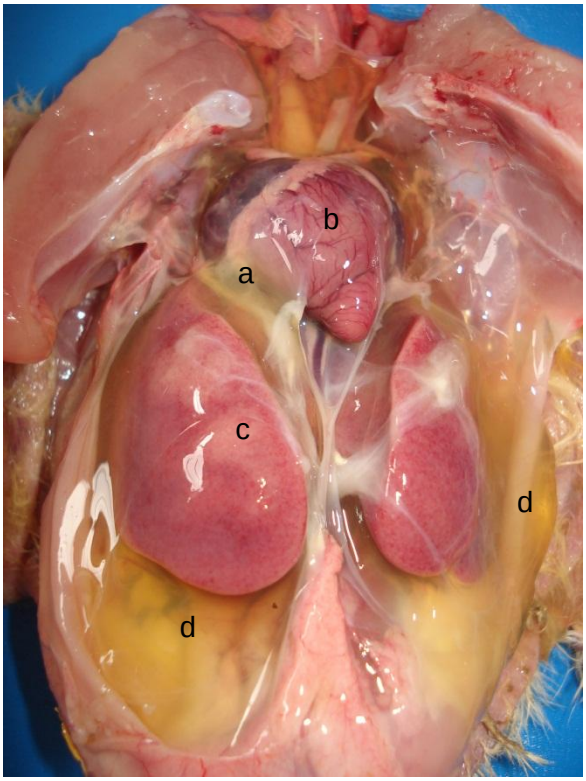
Los pollos de engorde mantenidos en la altura que padecían de HAP presentaron depresión, plumas erizadas, cianosis de crestas y barbillas, abdomen pendulante e incluso alguno presentaron muerte súbita sin signos clínicos y en la necropsia (ver Figura 2-2 y 2-3) se observó hidropericardio y ascitis en diferentes grados de severidad, su contenido era de consistencia líquida y también en forma de gel, los músculos de la pechuga, el hígado y el riñón presentaban congestión generalizada, los pulmones con congestión severa, el corazón exhibía forma redondeada, dilatación cardiaca derecha y hubo variaciones en el valor del índice cardiaco.

Figura 2-2. Hallazgos macroscópicos en los pollos enfermos por HAP



a) Depresión, postración y aumento de tamaño en el abdomen. b) Hidropericardio severo. c) Pulmón de color rojizo (congestión pulmonar), Cardiomegalia, aurículas y vasos sanguíneos pletóricos, dilatación cardiaca derecha. d) Cardiomegalia, dilatación cardiaca derecha, corazón normal.

Figura 2-3 .Hallazgos a la necropsia características de HAP:



a. hidropericardio, b. dilatación cardiaca derecha, c. hepatomegalia, d ascitis.

En las aves mantenidas bajo condiciones de hipoxia hipobárica se encontraron signos compatibles con HAP, a su vez en la histopatología se encontró vasoconstricción en las arterias y arteriolas pulmonares. La mortalidad general apareció a partir del día 6, se mantuvo a lo largo del tiempo y la mortalidad acumulada al día 42 de edad en los machos fue del 35,2% y en las hembras del 53,8% (Figura 2-4); por lo tanto, se encontró una mayor mortalidad en la hembra debida a HAP y adicionalmente, la mortalidad de la hembra tiene una correlación de pearson r=0,482 (p=0.273) lo cual es no significativa con la ganancia de peso, pero se muestra una tendencia a presentar mayor mortalidad en la semana 3, 4 y 5 (Figura 2-5).

Figura 2-4. Porcentaje de mortalidad diaria de la hembra y del macho en las aves expuestas a hipoxia hipobárica.

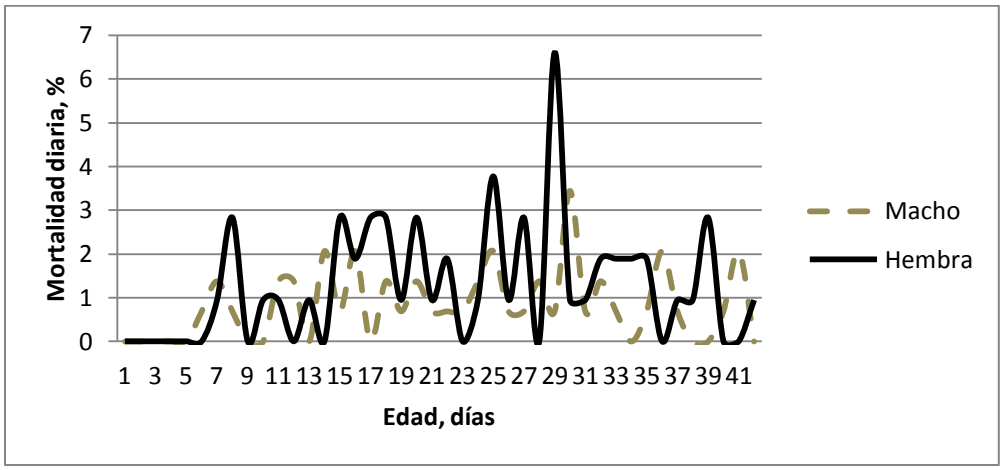
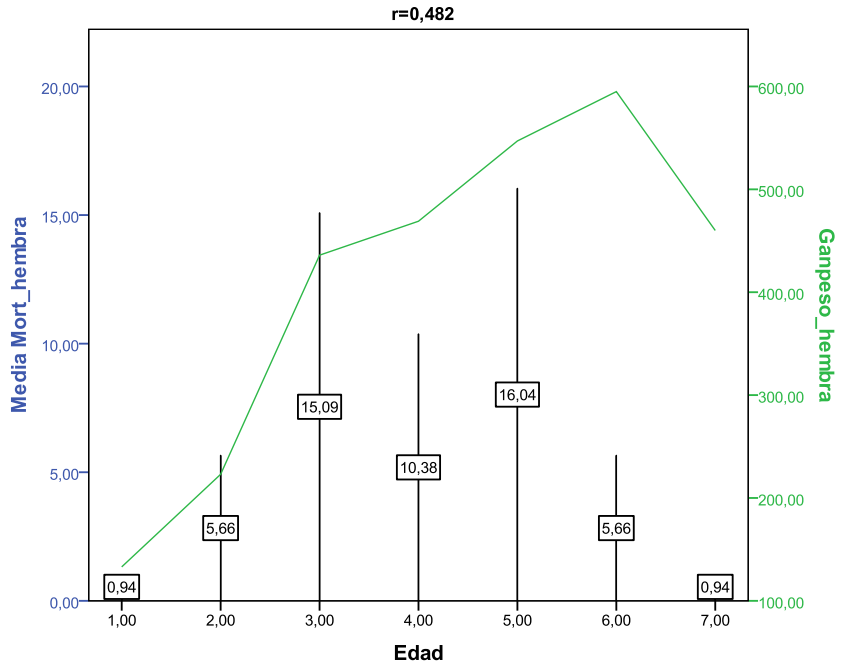


Figura 2-5. Relación entre la tasa de mortalidad relativa y la ganancia de peso semanal en las hembras mantenidas bajo condiciones de hipoxia hipobárica.



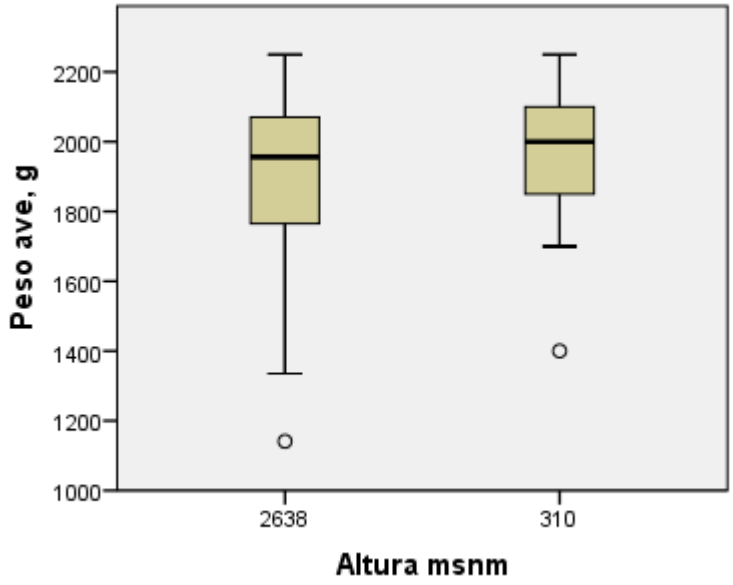
r: Correlación de Pearson

En la altura, la HAP fue la responsable del 90,6% de la mortalidad total en los machos debido a que las aves muertas tenían un IC mayor a 25 y el 84,9% de los machos tenían

IC mayor a 30. Por otra parte, en las hembras la HAP generó el 96,4% de la mortalidad total y todas tenían un índice cardiaco mayor a 30.

A la edad de 33 días los pollos se pesaron al azar, en la zona baja (n:22) el peso corporal tuvo un promedio de 1968 ± 186 y en la altura (n:50) 1830 ± 298, en los dos lotes no se encontraron diferencias significativas (p<0,05) en el peso corporal obtenido, sin embargo, los pesos fueron más dispersos en las aves expuestas a hipoxia hipobárica (Coeficiente de variación, CV=16.2%) con respecto a la normoxia relativa (CV=9.4%) Ver figura 2-6.

Figura 2-6. Peso corporal de las aves a los 33 días de edad según la altura de crianza.



Los pollos mantenidos en baja altitud bajo condiciones de normoxia relativa tuvieron una mortalidad acumulada del 1%; en las aves sacrificadas al día 33 no evidenciaron lesiones compatibles con HAP, ni con otra patología y el rango de índice cardiaco estuvo entre 14,8 y 20,5.

En los machos mantenidos en hipoxia hipobárica y sacrificados al día 33 (n=48), el 64% desarrolló HAP (IC>25), el 33% presentó ascitis en diferente grado de severidad, el 82% evidenció hidropericardio, mientras que en normoxia relativa no hubo evidencia de ascitis y el índice cardiaco fue menor a 21 en todas las aves, solamente el 13,6% de los pollos evidenciaron hidropericadio de categoría leve. Se observo que los pollos que presentaron

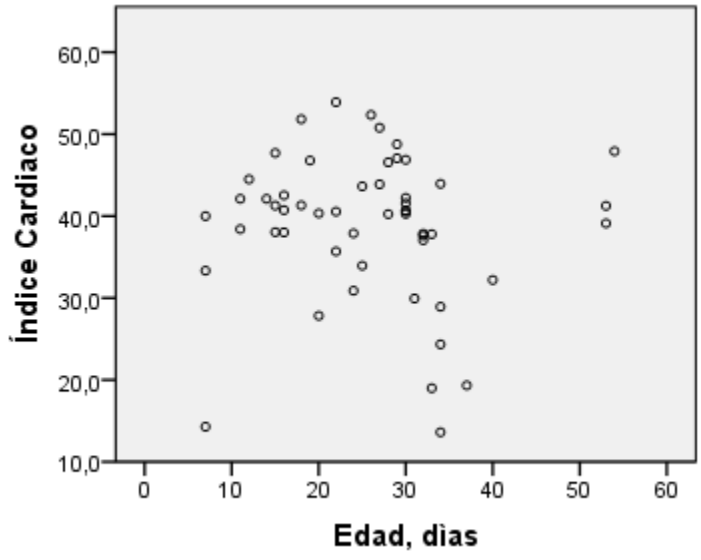
ascitis de gravedad moderada o severa tuvieron mayor IC, pero animales que no presentaron ascitis también tienen índice cardiaco mayor de 30 (ver Tabla 2-2).

Tabla 2-2.Valores del índice cardiaco según el grado de severidad de ascitis en pollos con HAP

Índice cardiaco	**Ascitis**			
	Ausente	Leve	Moderado	Severo
N	32	4	4	8
Media	21,6	31,0	36,2	39,1
Desviación típica	7,2	8,2	2,9	4,8

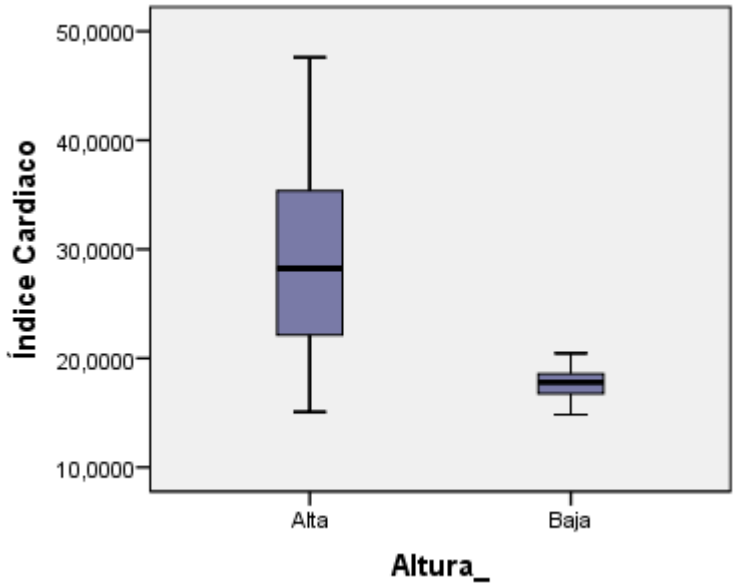
Al analizar el valor del IC de pollos machos en razón de la edad de la mortalidad espontánea hallada en la altura se observo que no hay ninguna relación entre el IC y la edad de muerte espontánea Correlación de Pearson r=-0.064 (p=0.649) (Figura 2-7). Los valores del IC de las aves que presentaron mortalidad espontánea durante el experimento fueron en los machos 41.7±7.3 y en la hembra 38.9±8.9. La altura sobre el nivel de mar y la hipoxia hipobárica de la altura tienen un efecto directo sobre el IC (p<0,01), se observó mayor IC en los pollos de engorde criados en la altura (Figura 2-8).

Figura 2-7. Relación entre la edad de mortalidad espontánea y el índice cardiaco de los pollos machos.



r=-0.064

Figura 2-8. Valor del índice cardiaco de aves según la altura de crianza



Diferencia significativa P<0,01

Al comparar la medias del IC de los tres grupos experimentales, encontramos diferencias significativas (P<0,01) (Tabla 2-3). El 82% de los pollos mantenidos en hipoxia hipobárica tuvieron hidropericardio y se observo que el grado de severidad subjetivo del contenido líquido en el saco pericárdico en el momento de la necropsia (ausente, leve, moderado y severo) era mayor a medida que aumentaba el hidropericardio (Figura 2-9).

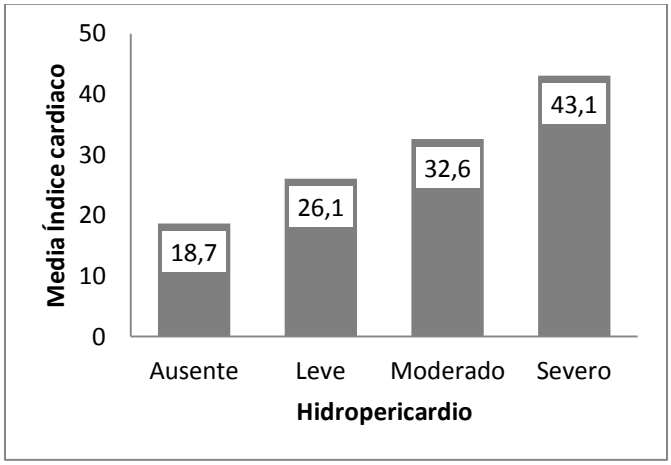
Tabla 2-3. Valores del índice cardiaco según el grupo experimental

Índice Cardiaco	A	B	C
N	19	18	22
Media	37,2*	20,5**	17,6**
Error típico de la media	1,0	0,7	0,3
Desviación típica	4,2	2,8	1,5
Máximo	47,6	24,9	20,5
Mínimo	31,8	15,1	14,8

A. Aves expuestas a hipoxia hipobárica (altura) enfermas.
B. Aves expuestas a hipoxia hipobárica (altura) sanas.
C. Aves expuestas a normoxia relativa (baja altitud) sanas.

*,**. Indican diferencias significativas p<0.01

Figura 2-9. Valores del índice cardiaco según el grado de severidad de hidropericardio.



2.5 Discusión:

Las hembras de pollos de engorde evidenciaron una mortalidad acumulada del 53,8 % de la cual el 96.4 % fue debida a HAP y presentaron un IC promedio de 41,7±7,3; mientras que los machos tuvieron una mortalidad total de 35, 2 %, el 90.6% por HAP con IC de 38.9±8,9, se puede concluir que las hembras y los machos son muy sensibles a desarrollar la HAP y a morir por esta causa. La HAP continua siendo una enfermedad que produce una mortalidad muy alta, lo cual afecta de manera significativa la eficiencia productiva y la rentabilidad en las explotaciones avícolas que se crían en la altura, antes mencionado por (Bottje *et al*. 1995), Arce (1998), Guo *et al* (2007).

La mortalidad se incrementó en la tercera, cuarta y quinta semana, al igual que en los experimentos de Hernández, (1982); López, (1982); Moreno & Hernández, (1996), al mismo tiempo hay una tendencia entre la mortalidad y los valores de ganancia de peso semanal (r=0,482), lo cual se puede deber a un mayor requerimiento de oxígeno en las células y en los tejidos implicados en el crecimiento y el desarrollo de los pollos de engorde, similar a lo expuesto por Druyan *et al*., (2007), también se encuentra una alteración en el intercambio gaseoso e ingreso de oxígeno al organismo debido a la menor presión hipobárica que se encuentra en la altura, entonces este desequilibrio entre el suministro y la demanda incrementada de oxígeno en la etapa de crecimiento es un

factor coadyuvante muy importante pero la hipoxia y/o las temperaturas menores a 16°C son los factores determinantes en la fisiopatología de la HAP.

Los pesos obtenidos al día 33 de edad en los animales expuestos a hipoxia hipobárica tuvo una alta variabilidad (1830 ± 298, CV=16.2%), probablemente debido a que algunos pollos se encontraban en proceso patológico por HAP que afectó su normal crecimiento y otros que estaban sanos con el peso esperado según la edad y la estirpe genética posiblemente por factores individuales de adaptación, lo cual también se explica por la ausencia en la relación entre el IC y la edad de muerte espontánea (r=-0,064), por lo tanto el tiempo de exposición a la hipoxia hipobárica no influye sobre la forma de presentación y no afecta la manifestación de la enfermedad y se puede deducir que la susceptibilidad a la muerte por causa de HAP se debe a un factor individual, similar a lo planteado por Huchzemeyer *et al,* (1988).

En el presente estudio se encontraron pollos enfermos por HAP con o sin presencia de ascitis, por lo cual se demuestra que la ascitis sólo es un signo de HAP y puede o no encontrarse en la fase aguda de la enfermedad. Por otra parte, en los animales mantenidos en hipoxia hipobárica, se encontró una tendencia entre la severidad del hidropericardio y el valor del IC de los pollos evaluados, por esta razón el hidropericardio se puede convertir en un hallazgo a la necropsia muy concluyente de la presencia de HAP (Druyan *et al*, 2007).

2.6 Bibliografía

1. Agriculture and Agri-food Canada. 2004. Poultry Marketplace:Chicken Condemnations 2004 January Condemnation Report. English. (Note: 2003 data is summarized in the monthly reports for 2004) http://www.agr.gc.ca/misb/aisd/poultry/documents/C0401CHI.pdf
2. Alexander AF., Jensen, R. 1959. Gross cardiac changes in cattle with high mountain disease and in experimental cattle maintained at high altitudes. Am J Vet Res 20: 680 – 689.
3. Anthony, N.P., J.M. Balog, F.B. Staudinger, C.W. Wall, R.O. Walker, and W.E. Huff. 1994. Effect oral urease inhibitor and ceiling fans on ascites in broilers. I. Environmental variability and incidence of ascites. Poult Sci 73:801-809.
4. Arce, M.J. 1998. El efecto del medio ambiente sobre la presencia del síndrome ascítico en el pollo de engorde. *Vet. Méx.* 29(3): 221 – 225.
5. Areiza, R.A., Rivas, P.C., Hernández, A. 2011. A Quantitative Study of the Pulmonary Vascular Bed and Pulmonary Weight: Body Weight Ratio in Chickens Exposed to Relative Normoxia and Chronic Hypobaric Hypoxia. J poult sci. 48(4): 267-274.

6. Balog,J.M., N.B. Anthony, C.W.Wall, R.O. Walker, N.C. Rath, and W.E. Huff. 1994.E ffect of a urease inhibitor and ceiling fans on ascites in broilers. 2. Blood variables, ascites scores, and body and organ weights. Poult Sci 73:810-816.
7. Beaver, B. V. *et al*. (2001). JAVMA, Vol 218, No. 5, March 1, 669-696.
8. Bottje, W.G.; Wideman, R.F. 1995. Potential role of free radicals in the pathogenesi s of pulmonary hypertension syndrome. *Poultry and Avian Biology Reviews, 6*, 211-231.
9. Burton RR., Smith AH. 1967. Effect of policytemia and chronic hypoxia on heart mass in the chicken. J. Appl. Physiol. 22 (15): 782-785.
10. Chicken Farmers of Canada 2004. Chicken Data Guide 2004. http://www.chicken.ca/app/DocRepository/1/Data_Handbook/2004_Data_Booklet.pdf
11. Daneshyar M, Kermanshahi H, and Golian A. 2009. Changes of biochemical parameters and enzyme activities in broiler chickens with cold-induced ascites. Poultry Science 88:106–110
12. Druyan S., Shlosberg A. and Cahaner A. 2007. Evaluation of Growth Rate, Body Weight, Heart Rate, and Blood Parameters as Potential Indicators for Selection Against Susceptibility to the Ascites Syndrome in Young Broilers. Poultry Science 86:621–629
13. Guo, J. L., Q. H. Zheng, Q. Q. Yin, W. Cheng, and Y. B. Jiang.2007. Study on mechanism of ascites syndrome of broilers. Am. J. Anim. Vet. Sci. 2:62–65.
14. Gonzales E, Buyse J, Sayuri T, Sartori J, Decuypere E. Metabolic Disturbances in Male Broilers of Different Strains. 1. Performance, Mortality, and Right Ventricular Hypertrophy. 1998 Poultry Science 77:1646–1653
15. Guzmán, L, Sandino de M, Hernández, A. 2001.Hipertensión arterial pulmonar en pollos de engorde inoculados experimentalmente con mycoplasma gallisepticum. Rev Col Cienc Pec 14 (supl):55.
16. Hernández, A. 1982. Influencia de la altitud, la raza, el nivel energético de la ración y el sexo en la presentación de la ascitis de origen hipóxico en pollos de engorde. *Rev. Fac. Med. Vet. Zoot*. 10:39 - 41.
17. Hernández, A. 1984. Disminución de la incidencia de la ascitis aviar de origen hipóxico en elincremento de la temperatura en los galpones. XIV Cong. Nal. de Med. Vet. y Zoot. Cartagena. Memorias p. 6.
18. Huchermeyer, A.M.; De Ruyck, A.M.C.; Ark. V. 1988. Broiler pulmonary hypertension syndrome. III commercial broiler strains differ in their susceptibility. *Onderstepoort J Vet Res.* 55: 5-9.
19. Kutner, Michael H., Christopher J. Nachtsheim, John Neter and William Li. 2005. Applied linear statistical models. 5th ed. Boston: McGraw-Hill.
20. López-Coello,C, Casas LC, Paasch ML. 1982. Efecto de la altura sobre la presentación del síndrome ascítico. Memorias de la Reunion de Investigacion Pecuaria en Mexico. Mexico DF 1982, 214-217. Fac de Med. Vet, y Zoot. UNAM. Mexico
21. Marín, A. 1980. Estudio epidemiológico retrospectivo del edema aviar en Colombia. Tesis M.Sc. Universidad Nacional-ICA. Bogotá, p. 56.
22. Maxwell, M. H., and G. W. Robertson. 1997. World broiler ascites survey. Poult. Int. 36:16–30.
23. Moreno, De S.M. 1984. Variación cardiopulmonar y en los valores de hemoglobina y hematocrito durante la hipoxia en pollos comerciales y criollos. Tesis M.Sc. Universidad Nacional. Bogotá.
24. Moreno, M.J. y A. Hernandez. 1996. La Hipertension Pulmonar en Pollos de Engorde. Patogenesis, Control y Perspectivas de Investigacion. Rev del CEISA (Centro de Investigacion en Salud y Produccion Animal) 3: 65-85.
25. Pan, J. Q.; Tan, X.; Li, J. C.; Sun, W. D.; Wang, X. L. 2005. Effects of early feed restriction and cold temperature on lipid peroxidation, pulmonary vascular remodelling and

ascites morbidity in broilers under normal and cold temperature. *British Poult. Sci* . 46 (3): 374–381.

26. Rengifo, L.J. 1979. Poliserositis en pollos barrilleros (Bolsa de agua). En: Congreso Latinoamericano de Avicultura, 6º. Anales. Ivita. P. 32 – 38.
27. Sillau, A. H., y C. Montalvo. 1982. Pulmonary hypertension and the smooth muscle of the pulmonary arterioles in chickens at high altitude. Comparat Biochem Physiol A Comp Physiol 71:125-130.
28. Vásquez, I.C., Hernández, A. 2012. Hipertensión pulmonar en pollos, lapso de exposición a la hipoxia hipobárica y relación peso pulmonar: peso corporal, bajo condiciones de temperatura controlada. Rev. Colomb. Cienc. Pecu. 25: 81-89.
29. Zhang, H., Wu, C.X., Chamba, Y., Ling, Y. 2007. Blood Characteristics for High Altitude Adaptation in Tibetan Chickens. Poult Sci 86(7): 1384 - 1389.

3 Expresión de la proteína ET-1 en arterias pulmonares de pollos de engorde expuestos a hipoxia hipobárica

3.1 Resumen

La hipoxia hipobárica produce Hipertensión Pulmonar Arterial (HAP), que comienza con la disfunción endotelial como consecuencia de la hipoxia, y la secreción desbalanceada de sustancias vasoactivas, dentro de las cuales la endotelina 1 (ET-1) tiene un papel importante, esta se produce en las células endoteliales pero migra a la túnica muscular donde produce contracción de las células musculares lisas y por consiguiente de las arterias pulmonares.

Se criaron pollos de engorde de una estirpe comercial a 2638 m.s.n.m. y a 310 m.s.n.m. y se determinó el efecto de exposición a la hipoxia hipobárica sobre la incidencia de HAP, así mismo, se identificó y se comparó los niveles de expresión de la proteína ET-1 en arterias pulmonares de pollos de engorde sanos y enfermos por HAP mediante la inmunohistoquímica. En los pollos sometidos a hipoxia hipobárica, la mortalidad acumulada al día 42 de edad en los machos fue del 35,2% y en las hembras del 53,8%. La altura tienen un efecto directo sobre el IC ($p<0,01$), se observó mayor IC en los pollos de engorde criados en hipoxia hipobárica.

La expresión de la proteína ET-1 fue mayor en los pollos expuestos a hipoxia hipobárica ($p<0,01$), así mismo, los animales enfermos por HAP presentaron mayor expresión de la proteína ET-1 en las arterias pulmonares comparado con los animales sanos ($p<0,01$).

La expresión de la ET-1 en arterias pulmonares se puede sugerir como el factor clave en la patogénesis de la HAP, así como, en la respuesta de los pollos a las condiciones ambientales de hipoxia hipobárica y en la adaptación de los animales a la altura.

Palabras clave: Hipertensión arterial pulmonar, expresión, proteína, endotelina 1, pollos de engorde.

3.2 Introducción

La Hipertensión Arterial Pulmonar (HAP) de origen hipóxico es una enfermedad que afecta a múltiples especies animales incluyendo al hombre; el pollo de engorde se caracteriza por ser muy susceptible a desarrollar la enfermedad cuando se somete a ambientes de hipoxia crónica. Por representar una grave y hasta ahora incurable enfermedad en los humanos, es de vital importancia conocer y entender su patogénesis con el fin tratar de controlarla.

El pollo de engorde tiene una marcada susceptibilidad a la hipoxia hipobárica y cuando son criados en las grandes alturas pueden desarrollar el síndrome de hipertensión arterial pulmonar (HAP). La causa de este síndrome es la hipoxia, debida a la baja tensión de oxígeno atmosférico (Cueva *et al,* 1974). La temperatura ambiental también es un factor desencadenante de HAP en pollos de engorde susceptibles (Rengifo, 1979; Mejía, 1982; Hernández, 1984; Pan *et al,* 2005; Daneshyar *et al*, 2009).

La HAP en pollos de engorde es un problema económico serio; Maxwell y Robertson (1997), reportaron la presentación de HAP en 18 países de 4 continentes y afecta al 4,7% de los pollos del todo el mundo. Guo *et al* (2007), plantearon que la HAP era responsable del 25% de la mortalidad total en los lotes de pollos de engorde. Arce (1998), afirmó que para 1995, el 70% del total de las explotaciones de pollo de engorde de México, es decir unos 630 millones de aves se localizaban en zonas altas y que se reportaba una mortalidad de 3% a causa de la enfermedad. En Estados Unidos, se registraron mortalidades en las aves del 2 a 5%, con pérdidas de alrededor de los 100 millones de dólares anuales (Bottje *et al*. 1995). En Canadá se estimó en el 2004 que la mortalidad debida a HAP en la industria de pollo mundial generó pérdidas del orden de $

500 billones de dólares por año (Chicken Farmers of Canada, 2004; Agriculture and Agri-Food, Canada, 2004).

La importancia económica de la HAP está centrada principalmente por la mortalidad, el porcentaje de decomisos en las plantas de sacrificio, la pobre conversión alimenticia y el deterioro en el estado de salud de las aves que las predispone a patologías de tipo secundario; por otra parte, las pérdidas económicas en las explotaciones de pollo de engorde también se relacionan con la aplicación de medidas preventivas para mitigar los efectos de la enfermedad, como por ejemplo los planes de restricción alimenticia que buscan un retardo en el crecimiento inicial, pero que generan ciclos de producción de mayor duración lo que aumenta los costos de producción.

Cuando hay una exposición prolongada a hipoxia hipobárica o a una baja disponibilidad de O_2 se activan las células endoteliales (Dore-Duffy *et al*, 1999), adicionalmente, el estrés hemodinámico que acompaña a la HAP puede generar cambios en la estructura y en la función del endotelio (Mombouli & Vanhoutte, 1997), debido a esto, se genera disfunción endotelial que conlleva a una alteración en el balance de las moléculas vasoactivas pulmonares provocando vasoconstricción pulmonar, proliferación de células musculares lisas de los vasos y trombosis *in situ* característico de la HAP (Coggins & Blotch, 2007); cuando se produce la disfunción endotelial, se altera este balance y el endotelio sintetiza una mayor cantidad de sustancias vasoconstrictoras tales como la ET-1, la serotonina y el tromboxano A_2 (TxA_2) y una menor cantidad de vasodilatadores como el óxido nítrico (NO), la prostaciclina y el factor de hiperpolarización derivado del endotelio (EDHF).

La endotelina (ET) es el vasoconstrictor endógeno más potente conocido a la fecha y tiene una acción fisiológica prolongada, fue descubierta por Yanagisawa *et al* (1988), tiene un peso molecular de 2492 Da, posee grupos amino y carboxilo libres en los extremos y dos puentes disulfuro intracadena entre los residuos cys^1-cys^{15} y cys^3-cys^{11} (Goto *et al*, 1996).

En el análisis del genoma humano se reveló que hay tres isopéptidos de endotelina; ET-1, ET-2, ET-3, cada una codificada por diferentes genes localizados en los cromosomas

6, 1 y 20 respectivamente (Inoue, *et al* 1989). La ET-1 es la única isoforma sintetizada en las células endoteliales, también es sintetizada en el epitelio de las vías aéreas, el corazón, el riñón, la pituitaria, el sistema nervioso central y las células musculares lisas; sin embargo, sus concentraciones son extremadamente bajas comparadas con las detectadas en las células endoteliales (Bouallegue *et al,* 2007); la distribución de la ET-2 es restringida al riñón e intestino y la ET-3 se expresa en el cerebro, pulmón, intestino y glándula adrenal (López-Jaramillo, 1998).

El gen de la ET-1 humana tiene 5 exones y 4 intrones, con regiones 3`y 5` y aprox. 6.8 Kb de DNA. Cada uno de los 5 exones codifica una porción de pre-endotelina 1. El análisis de secuencia de cDNA de ET-1 reveló la existencia de un gen que codifica para un precursor, Preendotelina- 1. Prendotelina-1 en humanos es una proteína de 212 aminoácidos que es proteolíticamente separada por una endopeptidasa específica (furina) en las posiciones Lys^{51}-Arg^{52} y Arg^{92}-Arg^{93}, produciendo un péptido de 38 aminoácidos llamado Gran Endotelina 1, la cual subsecuentemente también es separada en la posición Trp21-Val22 por una endopeptidasa llamada enzima convertidora de endotelina (ECE), así se produce la ET-1 (Inoue *et al*, 1989). El gen de la ET-1 en el humano se encuentra en el cromosoma 6, el mRNA tiene 2117 pb y la proteína está conformada por 212 aminoácidos y tiene un peso molecular de 26 KDa, mientras que en el *Gallus gallus* el gen de la ET-1 se encuentra en el cromosoma 2, el mRNA y la proteína aún continúan en estudio (*GenBank*).

Hay 2 isoformas de receptores de ET: el receptor tipo A de la endotelina (ETA) y el receptor tipo B de la endotelina (ETB); el ETA es específico para ET-1 y ET-2 pero con baja afinidad para ET-3 y se encuentra en tejidos como el corazón, el pulmón, el intestino y principalmente en las células musculares lisas de los vasos sanguíneos donde desarrolla el efecto paracrino de vasoconstricción de la ET-1; mientras que, el ET_B se liga a las 3 ET y está localizado en las células endoteliales, en las células musculares lisas, el cerebro, el pulmón y el riñón; hay 2 tipos de ET_B; (1) ET_B1 con efecto autocrino sobre las mismas células endoteliales de vasodilatación por la acción de la liberación de NO y (2) ET_B2 también con efecto de vasoconstricción en células musculares lisas por la acción de la ET-1 (Seo *et al*, 1994; Inagami *et al* 1995). El gen del receptor ETA en el humano se encuentra en el cromosoma 4, el mRNA tiene 4168 pb y la proteína tiene 427

aminoácidos y pesa 69 KDa, mientras que en el *Gallus gallus* el gen se encuentra en el cromosoma 4, el mRNA tiene 2988 pb y la proteína tiene 421 aa.

Las endotelinas son reguladas por cambios en la expresión genética en respuesta a una amplísima variedad de estímulos físicos (desgarro o tensión) y químicos (hipoxia, endotoxina, trombina, adrenalina, Ang II y citoquinas) (López-Jaramillo, 1998).

La ET-1 endógena modula el tono vascular y el flujo sanguíneo regional como una hormona circulante o ejerce su acción localmente dentro de la pared vascular y en el endotelio de forma autocrina y paracrina (Goto *et al*, 1996). La ET-1 promueve la proliferación de células endoteliales, células musculares lisas y de fibroblastos lo cual puede resultar en cambios estructurales en la pared vascular llevando a la remodelación (Inagami, 1995). La ET-1 ejerce efectos crónicos implicados en la proliferación y la remodelación de los vasos sanguíneos; en varios estudios, la ET-1 ha sido involucrada en el estimulo de la expresión de los proto-oncogenes como *c–fos, c-jun* y *c-myc* (Pribnow *et al*, 1992), el incremento en la incorporación de 3H-timidina dentro del DNA causa proliferación de las células vasculares capilares, fibroblastos y células del músculo liso vascular, en estas últimas células la ET-1 tiene actividad mitógena directa por medio de la inducción en la expresión de mRNA de PDGF y TGF-β; también ET-1 tiene efecto mitógeno sinérgico con factores de crecimiento como PDGF, bFGF (por sus siglas en inglés: *Basic Fibroblast Growth Factor*), EGF (por sus siglas en inglés: *Endothelial Growth Factor*), insulina y Ang II (Goto *et al,* 1996).

La expresión del mRNA de ET-1 en cultivos de células endoteliales es estimulada por numerosos factores, incluyendo, la trombina (Emori *et al*, 1992), el factor de crecimiento transformante beta (TGF-β por sus siglas en inglés: *Transforming Growth Factor β*) (Kurihara *et al*, 1994), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α por sus siglas en inglés: *Tumor Necrosis Factor α*)(Marsden & Brenner, 1992), Interleukina 1 (IL-1), la Insulina, la Ang II, la vasopresina, los esteres de forbol y la epinefrina (Inagami, 1995).

El incremento de la expresión de ET-1 mRNA inducido por trombina, Ang II, y vasopresina es promovido por un incremento en el Calcio (CA^{2+}) intracelular y la activación de la proteína Quinasa C (PKC) por medio de la proteína ligante GTP como

consecuencia de la estimulación de sus receptores. Las endotelinas también afectan la vía de la adenil ciclasa; el receptor ET_A estimula marcadamente la adenil ciclasa probablemente por la vía de la proteína GS, mientras el ET_B esta acoplado negativamente a la adenil ciclasa probablemente vía proteína GI (Inagami, 1995).

Por otra parte, la expresión del mRNA de ET-1 en cultivos de células endoteliales es inhibido por el óxido nítrico, la prostaciclina, el péptido natruirético auricular (PNA) (Inagami, 1995). El PNA posiblemente activa la guanilato ciclasa A, produce cGMP, y activa proteína kinasa G; este cGMP suprime la formación de inositol trifosfato, lo cual resulta en la inhibición de la expresión del gen de prepo-ET-1, en células endoteliales de ratas (Emori *et al*, 1993; Inoue, 1996); entonces, la vasorelajación producida por el PNA sería por el efecto supresor de la producción de ET-1. El NO inhibe la producción de ET por la vía de los mecanismos del cGMP a través de la activación de guanilato ciclasa (Boulanger *et al*, 1990). PGI_2 produce cAMP por medio de la activación de adenil-ciclasa e inhibe la producción de ET-1. La heparina también disminuye la expresión de mRNA de ET-1 por la inhibición de la vía de PKC (Imai *et al*, 1992).

Una vez la ET-1 se une a su receptor ET_A, se activan varias vías de transducción de la señal, las cuales están asociadas con la hipertrofia, la migración y la proliferación de las células musculares lisas vasculares, los cardiomiocitos y las células mesangiales del riñón (Bouallegue *et al,* 2007).

La unión de la ET-1 a su receptor ET_A activa las proteínas G, entre las cuales la Gq es la que mejor traduce la señal generada por el receptor ET_A. La proteína Gq se caracteriza por tener tres subunidades designadas como (α (αq), β, γ) las cuales están asociadas con la membrana celular. En la forma inactiva del heterodimero Gq, la subunidad αq se encuentra ligada a la guanosina difosfato (GDP). En la forma activa el GDP cambia a guanosina trifosfato (GTP), la cual inicia la disociación del complejo αq (GTP) y las subunidades β-γ asociadas con la membrana (Pierce *et al*, 2002), su disociación conduce a la activación de la fosfolipasa C tipo β específica al fosfoinositol (PLC β), la cual hidroliza en la membrana lipídica al fosfatidilinositol 4-5 bifosfato (PtdIns $(4,5)P_2$) en dos segundos mensajeros: el diacilglicerol (DAG) el cual es hidrofóbico y permanece en la membrana celular y el inositol 1-4-5 trifosfato (Ins$(1,4,5)P_3$) de tipo soluble (Fukami,

2002). El Ins(1,4,5)P_3 se difunde a través del citoplasma y activa los canales de Calcio^{2+} del retículo sarcoplásmico. La activación de los canales de Calcio^{2+} genera un incremento del calcio en el citoplasma y por ende estimula la contracción del musculo liso vascular. El DAG junto con el calcio activan la proteína Quinasa dependiente de la fosfatidilsecina o proteína Quinasa C, PKC, la cual media la actividad mitógena de la ET-1 (por sus siglas en inglés: *Protein Kinase C*)(Simonson *et al*, 1993; Bouallegue *et al,* 2007). La actividad de la PKC mediada por la ET-1, modula la proliferación y la contracción de las células musculares lisas; de esta forma, la ET-1 induce la activación de la PKC, que junto con sus efectores intracelulares son de gran importancia para la regulación del tono vascular local (Bouallegue *et al,* 2007).

Las elevaciones del Ca^{2+} nuclear y citoplasmático incrementan la unión del factor de transcripción de la proteína activadora 1, AP-1 (por sus siglas en inglés: *Activator Protein-1)*. El incremento de la actividad de unión de AP-1, potencialmente estimula la síntesis de vasoconstrictores y mitógenos derivados del endotelio pulmonar, debido a que los sitios de unión de la AP-1 están presentes en la región promotora de la mayoría de los genes involucrados en la proliferación de las células musculares lisas. Algunos de estos genes son el PDGF, la ET-1 y el VEGF, los cuales estimulan la contracción y la proliferación de las células musculares lisas de la arteria pulmonar a través de la unión paracrina a sus receptores presentes en dichas células (Mauban *et al,* 2005).

Varios estudios clínicos en humanos sugieren el papel de la ET plasmática en la fisiopatología de arterioesclerosis (Lerman *et al*, 1991) y en la hipertensión inducida por ciclosporina (Mihatsch *et al*, 1988); pero, concluyeron que los niveles plasmáticos de ET no reflejan la producción local de ET porque la mayoría de la ET es secretada y utilizada en la vasculatura circundante.

Adicionalmente, la hipoxia genera un incremento en la inducción transcripcional de genes que codifican sustancias que participan en el proceso de la remodelación vascular como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, PDGF (por sus siglas en Inglés: *Platelet-Derived Growth Factor*), el factor de crecimiento endotelial vascular, VEGF (por sus siglas en Inglés: *Vascular Endothelial Growth Factor*), el factor de crecimiento similar a la insulina, IGF (por sus siglas en Inglés: *Insulin-Like Growth Factor*), la familia de

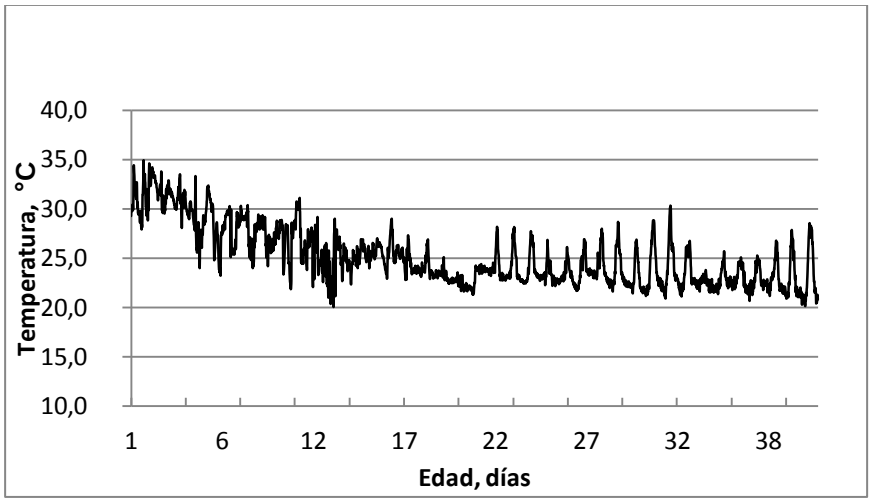
péptidos que actúan como factores de crecimiento de los fibroblastos, FGF (por sus siglas en Inglés: *Fibroblast Growth Factor*), la trombospondina-1, entre otros. Diversos factores de transcripción median la inducción transcripcional de estos genes en respuesta a la hipoxia, entre los que se destacan la proteína activadora 1, AP-1 (por sus siglas en Inglés: *Activator Protein*-1), el factor nuclear-κB y el factor de transcripción inducido por la hipoxia, HIF-1 (por sus siglas en Inglés: *Hypoxia Inducible Factor 1)* (Faller, 1999).

Sin embargo, aún no se conoce el patrón de expresión de las proteínas traducidas de dichos genes en pollos de engorde sanos y con HAP de origen hipóxico. En el presente trabajo se intentó identificar la proteína ET-1 en pulmones de pollos de engorde criados a 2638 msnm (hipoxia hipobárica) y a 400 msnm (normoxia relativa); así como, determinar la relación entre la identificación de ET-1 y el desarrollo de HAP en pollos de engorde.

3.3 Materiales y métodos

Se utilizaron pollos de engorde machos escogidos al azar de la estirpe genética comercial Cobb 500, procedentes de la misma planta de incubación ubicada a 300 m.s.n.m. Las aves fueron divididas aleatoriamente en **Lote 1:** 145 machos mantenidos bajo condiciones de hipoxia hipobárica natural a 2638 m.s.n.m. Edificio Avícola de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia (Bogotá, Colombia). Presión barométrica, PB: 560 mmHg; presión parcial de oxígeno, PO_2: 117 mmHg; PO_2 inspirado: 105 mmHg; y en **Lote 2:** 100 machos bajo normoxia relativa a 310 m.s.n.m. en una granja experimental (Nilo, Colombia) PB: 749 mmHg; PO_2: 155 mmHg; PO_2 inspirado: 143 mmHg. Todas las aves se mantuvieron bajo condiciones normales de producción, la alimentación fue según la recomendación de las tablas de consumo de la estirpe comercial; en el lote 1 se garantizó que la temperatura fuera superior a los 20°C (Figura 3-1.); mientras que, en el lote 2 la temperatura promedio fue de 27°C.

Figura 3-1. Temperatura ambiental (°C) del galpón a 2638 m.s.n.m.



A las aves se les realizó la eutanasia a los 33 días de edad, mediante dislocación cervical, un método físico que produce una depresión directa del sistema nervioso central y es aprobada por la Asociación Americana de Médicos Veterinarios (JAVMA, 2001; por sus siglas en ingles *American Veterinary Medical Association*). Con el objetivo de evaluar la presentación de HAP en cada lote se calculó el índice cardiaco (IC) en fresco, según lo establecido por Alexander & Jensen (1959), así: peso del ventrículo derecho (PVD) dividido por el peso de la masa ventricular total (MVT) multiplicado por 100. Teniendo en cuenta el IC encontrado en estudios previos para clasificar las aves muertas con o sin HAP (Areiza *et al*, 2011; Vásquez y Hernández, 2012), se obtuvieron 3 grupos experimentales según la altura sobre el nivel del mar de crianza y la presentación de HAP. Tabla 3-1.

Tabla 3-1. Grupos experimentales según la altura sobre el nivel del mar de crianza y la presentación de HAP.

	Lote 1 - Zona alta Hipoxia Hipobárica		Lote 2 - Zona Baja Normoxia relativa*
Número de Aves	**145**		**100**
Grupo experimental	A	B	C
Índice cardiaco-IC	>26	<25	<25

A. Aves expuestas a hipoxia hipobárica (altura) enfermas.
B. Aves expuestas a hipoxia hipobárica (altura) sanas.
C. Aves expuestas a normoxia relativa (baja altitud) sanas.
*En el grupo de aves expuestas a normoxia relativa en baja altitud no hubo mortalidad, ni aves enfermas con HAP.

Durante la necropsia se tomó el borde apical del pulmón derecho, se fijó en formalina bufferada, enseguida se realizó la imbibición de los tejidos en parafina y para la evaluación histológica se coloreó con un método estándar de hematoxilina-eosina y posteriormente se realizó inmunohistoquímica (IHQ) por medio del Supersensitive ™ Polymar-HRP IHC Detection System® (Biogenex) para las proteínas endotelina 1, ET-1, dilución 1:250 (Mouse monoclonal anti-endothelin 1, Thermo scientific MA3-005®, el antígeno es ET-1 de origen humano purificada, que se liga a un epítope en la región de ET-1 representada en los aminoácidos 8-16); receptor tipo A de la endotelina, ETA dilución 1:100 (Rabbit polyclonal anti-ETA , Thermo scientific PA1-20532®, el inmunógeno corresponde a un péptido sintético, la secuencia de aminoácidos es considerada a ser sensible comercialmente) y contra la sintasa de oxido nítrico endotelial, eNOS, dilución 1:100 (Rabbit polyclonal anti-eNOS, Thermo scientific PA1-037®, el inmunógeno es un péptido sintético correspondiente a los residuos S(1179)LQERQLRGAVPWAFD(1194) de eNOS de origen humano.

Se escogieron 4 animales de cada grupo experimental (Tabla 3-2) y a cada uno se realizó análisis morfométrico de 10 arterias entre 2 y 8 capas de músculo liso en el software IMAGE-PRO PLUS version 7 for Windows 2009, Media Cybernetics, Inc®.,

donde se evaluó el número de capas musculares, el número de células musculares, el número de células musculares con marcación positiva a la IHQ ET-1, el área total de la túnica muscular y el área de marcación positiva IHQ ET-1 en la túnica muscular.

Para la evaluación cuantitativa de la expresión de la proteína ET-1 en las arterias pulmonares, se escogieron 4 pollos por grupo experimental y en cada uno se tomaron 10 arterias que contenían en su capa media muscular entre 2 y 8 capas celulares, para un total de 40 arterias por grupo experimental (Tabla 3-2), las cuales se observaron con el microsopio óptico, (aumento de 40x), Una vez se tomaron las fotografías se procesaron las imágenes en el analizador de imágenes IMAGE-PRO PLUS® version 7 for Windows 2009, y se dejó únicamente su túnica muscular para las mediciones correspondientes. Se tomaron 2 variables de medición; en la primera, se contó el número total de núcleos para predecir el número total de células musculares lisas y se determinó cuántas células tenían algún grado de marcación y de está manera se obtuvo la variable, porcentaje de células musculares lisas positivas a la IHQ de ET-1; para la segunda variable se determinó el área total de la túnica muscular en micrómetros cuadrados (μm^2), luego, el área de coloración (IHQ positiva a ET-1) y de esta forma, se obtuvo el área de marcación positiva a la IHQ de ET-1 sobre un área fija de 100 μm^2 o el porcentaje de área de la túnica muscular con marcación positiva a la IHQ de ET-1.

La hipótesis nula fue que los resultados del peso, el IC y la expresión de la ET-1 (% células positivas ET-1 y % área positiva ET-1) fueron iguales en los grupos experimentales y una hipótesis alterna en la que al menos un tratamiento tiene resultados diferentes. El análisis se realizó mediante un modelo completamente al azar y se demostró que se cumplieron con los supuestos de homogeneidad del material experimental, también que el error experimental es una variable aleatoria independiente con distribución normal, media cero y homogeneidad de varianzas; cuando no se cumplió la homogeneidad de varianzas se realizó ANOVA con la prueba de Welch, la cual es robusta a la heterogeneidad de varianzas; cuando la prueba F o Welch resultó ser significativa se hizo una comparación múltiple de medias de Scheffe, que también es robusta a homogeneidad o heterogeneidad de varianzas. Igualmente se llevaron a cabo pruebas de correlación de Pearson para ver el grado de asociación entre las variables cuantitativas (Kutner *et al*, 2005). Para declarar diferencias estadísticas, el nivel de

significancia tuvo que ser menor de 0.01 ($P < 0.01$). El análisis de los datos se hizo con el *IBM®SPSS®predictiveanalytics software and solutions*, versión 17.

Tabla 3-2. Índice cardiaco, grupo experimental, sexo de los pollos utilizados en la inmunohistoquímica de ET-1.

No. Ave	Grupo experimental	Edad día	Sexo	IC*	No. Arterias
20	A	33	Macho	47.6	10
22	A	33	Macho	44.9	10
4	A	33	Macho	42.3	10
16	A	33	Macho	42	10
31	B	33	Macho	15.1	10
46	B	33	Macho	15.8	10
51	B	33	Macho	16.9	10
83	B	33	Macho	17.4	10
35	C	33	Macho	14.8	10
86	C	33	Macho	15	10
65	C	33	Macho	15.4	10
64	C	33	Macho	15.9	10

*IC, Índice cardiaco
A. Aves expuestas a hipoxia hipobárica (altura) enfermas.
B. Aves expuestas a hipoxia hipobárica (altura) sanas.
C. Aves expuestas a normoxia relativa (baja altitud) sanas.

3.4 Resultados

Para garantizar la validez de los resultados del modelo experimental se comprobaron sus supuestos, para lo cual se utilizaron pollos de engorde de la misma estirpe comercial y planta de incubación con el fin de tener material experimental homogéneo. Los pollos se dividieron de manera aleatoria, tanto en la hipoxia hipobárica como en la normoxia relativa y de esta forma se determina que el error experimental es una variable aleatoria independiente. La media es igual a cero porque la varianza de las variables respuestas se descompuso por el método de los mínimos cuadrados.

En las Tabla 3-3 y Tabla 3-4 se resumen los resultados de los supuestos del modelo en términos de homogeneidad de varianzas (prueba de Levene) y normalidad del error, P (W); también se presenta el coeficiente de determinación (R^2) y la probabilidad del análisis de varianza para la hipótesis nula (Sig ANOVA).

Tabla 3-3. Resumen del modelo completamente al azar para el factor Altura

Variable	R^2	Prueba Levene	P(W)	Sig ANOVA
Peso	0.027	0.1558	0.0002	0.171(1)
Indice cardiaco	0.379	0.0002	0.2639	0 (2)
% células positivas ET-1	0.397	0,0907(3)	0(3)	0 (3)
% área positiva ET-1	0.386	0.0318(3)	0(3)	0 (3)

(1). Probabilidad de la prueba F del ANOVA
(2). Probabilidad de la prueba Welch del ANOVA
(3). Variable transformada a Log 10

Tabla 3-4. Resumen del modelo completamente al azar para el factor Grupo experimental

Variable	R^2	Prueba Levene	P(W)	Sig ANOVA
Peso	0.073	0.117	0.0012	0.079(1)
Índice cardiaco	0.783	0.0175(3)	0.5161(3)	0(3)
% células positivas ET-1	0.765	0.0695	0	0(1)
% área positiva ET-1	0.731	0(4)	0.0613(4)	0(4)(2)

(1). Probabilidad de la prueba F del ANOVA
(2). Probabilidad de la prueba Welch del ANOVA
(3). Variable transformada a Log 10
(4). Variable transformada a raíz cuadrada

Como se observa en la Tabla 3-3 la distribución normal del error experimental para el factor altura, solamente la cumple la variable IC (P>0.01) y para el factor grupo experimental (Tabla 3-4) la cumplen las variables, IC y % área con marcación positiva (P>0.01); sin embargo la anormalidad del error no invalida los resultados de la prueba F.

En cuanto a la homogeneidad de varianzas para el factor altura (Tabla 3-3), las variables peso, % células positivas ET-1 y % área positiva ET-1 cumplen con el supuesto (p>0.01), mientras, que en el factor grupo experimental (Tabla 3-4), las variables peso, IC, % células positivas ET-1 cumplen con la homogeneidad de varianzas (p>0.01).

De acuerdo a los resultados del supuesto de homogeneidad de varianzas para el error experimental, las variables que cumplen con la homogeneidad de varianzas, el anova se realizó con la prueba F, en tanto que las que presentan heterogeneidad de varianzas (IC en altura (P=0.0002) y % área positiva ET-1 en grupo experimental (P=0)) el anova se

realizó con la prueba de Welch. En los factores altura y grupo experimental la hipótesis nula resulta no significativa para el peso, pero en las otras tres variables se acepta la hipótesis alterna. ($P<0.01$). (Ver Tabla 3-3 y Tabla 3-4 respectivamente).

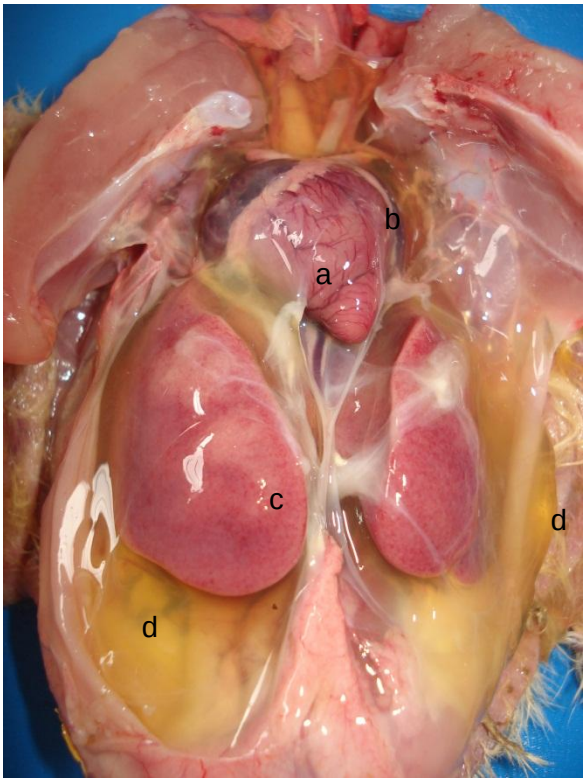
En cuanto al coeficiente de determinación (R^2), en este estudio es muy bajo para para la variable peso en los dos factores, y las otras tres variables tienen R^2 medio en el factor altura y muy bueno en el factor grupo experimental.

Los pollos mantenidos en baja altitud en condiciones de normoxia relativa tuvieron una mortalidad acumulada del 1%; en las aves sacrificadas al día 33 no evidenciaron lesiones compatibles con HAP, ni con otra patología y el rango de índice cardiaco estuvo entre 14,8 y 20,5.

En las aves mantenidas bajo condiciones de hipoxia hipobárica se encontraron signos compatibles con HAP, (Figura 3-2). La mortalidad acumulada a los 42 días de edad en los machos fue del 35,2%, la HAP fue la responsable del 90,6% ya que las aves muertas tenían un IC mayor a 25 y el 84,9% tenían IC mayor a 30.

A la edad de 33 días los pollos se pesaron al azar, en la zona baja (n:22) el peso corporal tuvo un promedio de 1968 ± 186 y en la altura (n:48) 1882 ± 262, en los dos lotes no se encontraron diferencias significativas (p=0,171), sin embargo, los valores obtenidos para el peso corporal fueron más dispersos en las aves expuestas a hipoxia hipobárica (Coeficiente de variación, CV=13.9%) con respecto a los encontrados para los pollos mantenidos en condiciones de normoxia relativa (CV=9.4%) Figura 3-3.

Figura 3-2. Hallazgos macroscópicos característicos de HAP



a. hidropericardio, b. dilatación cardiaca derecha, c. hepatomegalia, d ascitis.

La altura sobre el nivel de mar y la hipoxia hipobárica tienen un efecto sobre el IC ($p<0,01$), se observó mayor IC en los pollos de engorde criados en la altura (Figura 3-4). En los machos mantenidos en hipoxia hipobárica y sacrificados al día 33 (n=48), el 64% desarrolló HAP (IC>25), el 32% presentó ascitis en diferente grado de severidad, el 82% evidencio hidropericardio.

Figura 3-3. Peso corporal de las aves a los 33 días de edad según la altura de crianza.

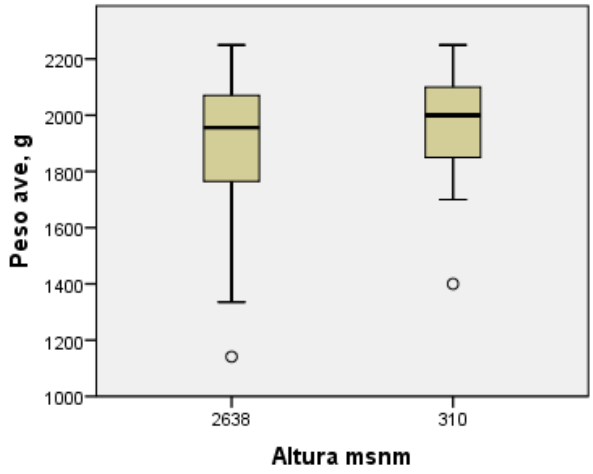
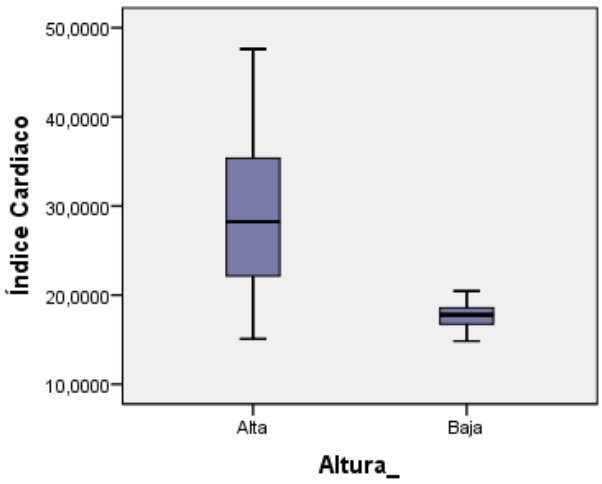


Figura 3-4. Valor del índice cardiaco de aves criadas a 310 y 2638 m.s.n.m.



Diferencia significativa P<0,01

Si se evalúa el valor del IC de los tres grupos experimentales, encontramos diferencias significativas (P<0,01) entre las medias del IC de los grupos experimentales (Tabla 3-5).

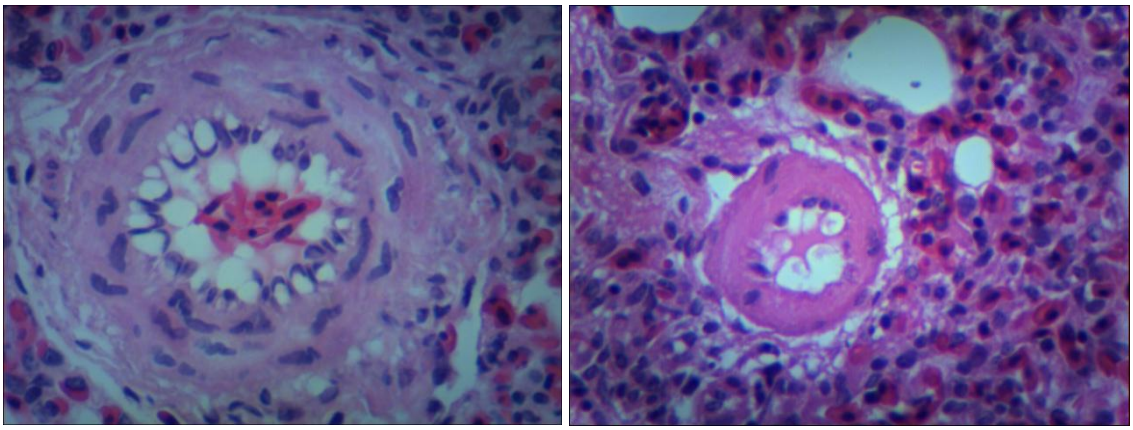
Tabla 3-5. Valores del índice cardiaco según el grupo experimental

Índice Cardiaco	A	B	C
N	30	18	22
Media	33,9(1)	20,5(2)	17,6(2)
Error típico de la media	1,0	,7	,3
Desviación típica	5,6	2,8	1,5
Máximo	47,6	24,9	20,5
Mínimo	26,3	15,1	14,8

A. Aves expuestas a hipoxia hipobárica (altura) enfermas.
B. Aves expuestas a hipoxia hipobárica (altura) sanas.
C. Aves expuestas a normoxia relativa (baja altitud) sanas.
(1) (2) Valores significativamente diferentes en $p < 0.01$

En la evaluación histológica en los animales enfermos se encontró engrosamiento de la túnica media muscular de las arterias pulmonares (Figura 3-5).

Figura 3-5. Cortes histológicos de pulmón de animales sanos y enfermos con HAP.

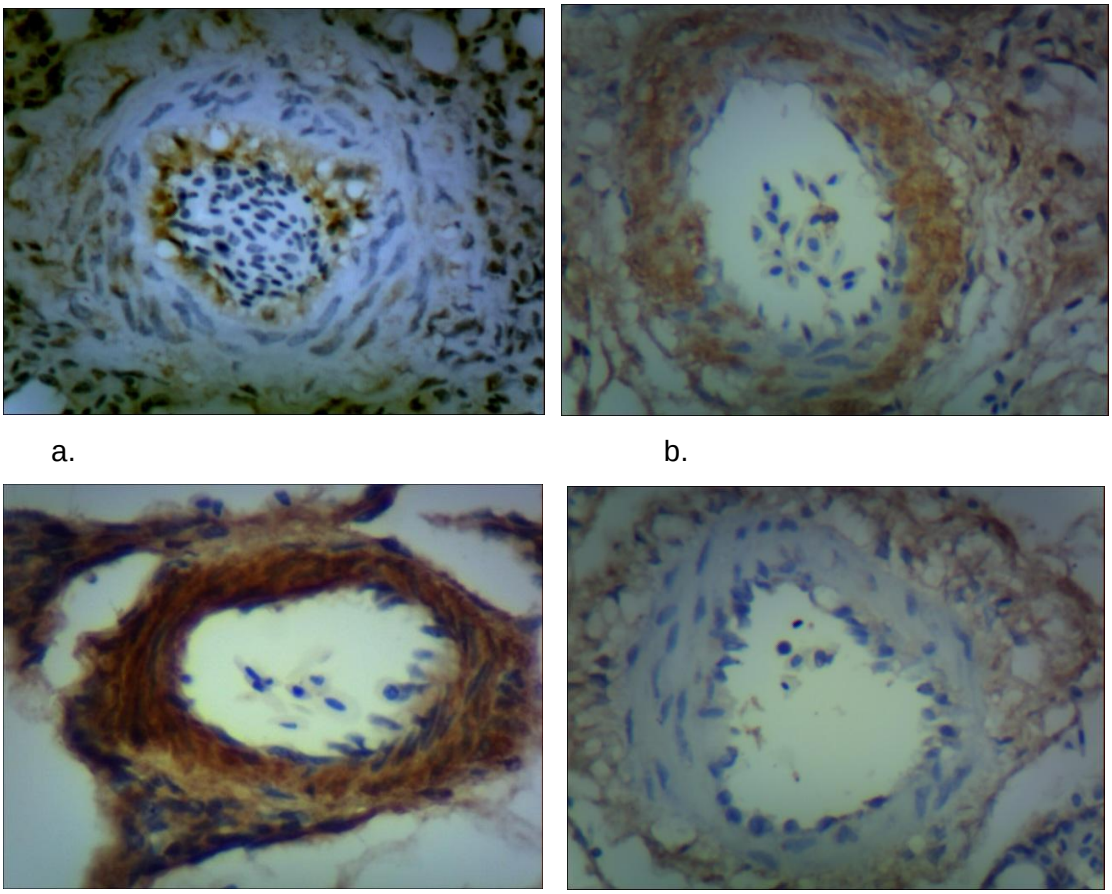


a) b)

a) Pulmón de pollo con HAP, hay engrosamiento de la capa media de células musculares lisas en una arteriola pulmonar. b. Arteriola pulmonar de un pollo sin HAP sano. Ampliación 40x.

La IHQ para las proteínas receptor tipo A de la endotelina (ETA) y para la sintasa de oxido nítrico endotelial (eNOS) no funcionó; sin embargo, en el análisis de la inmuhistoquímica de ET-1 se encontró marcación positiva en el endotelio, células musculares lisas y en la adventicia de arterias y arteriolas pulmonares (Figura 3-6)

Figura 3-6. Inmunohistoquímica de arteriolas pulmonares de pollos coloreadas para ET-1.



a. b.

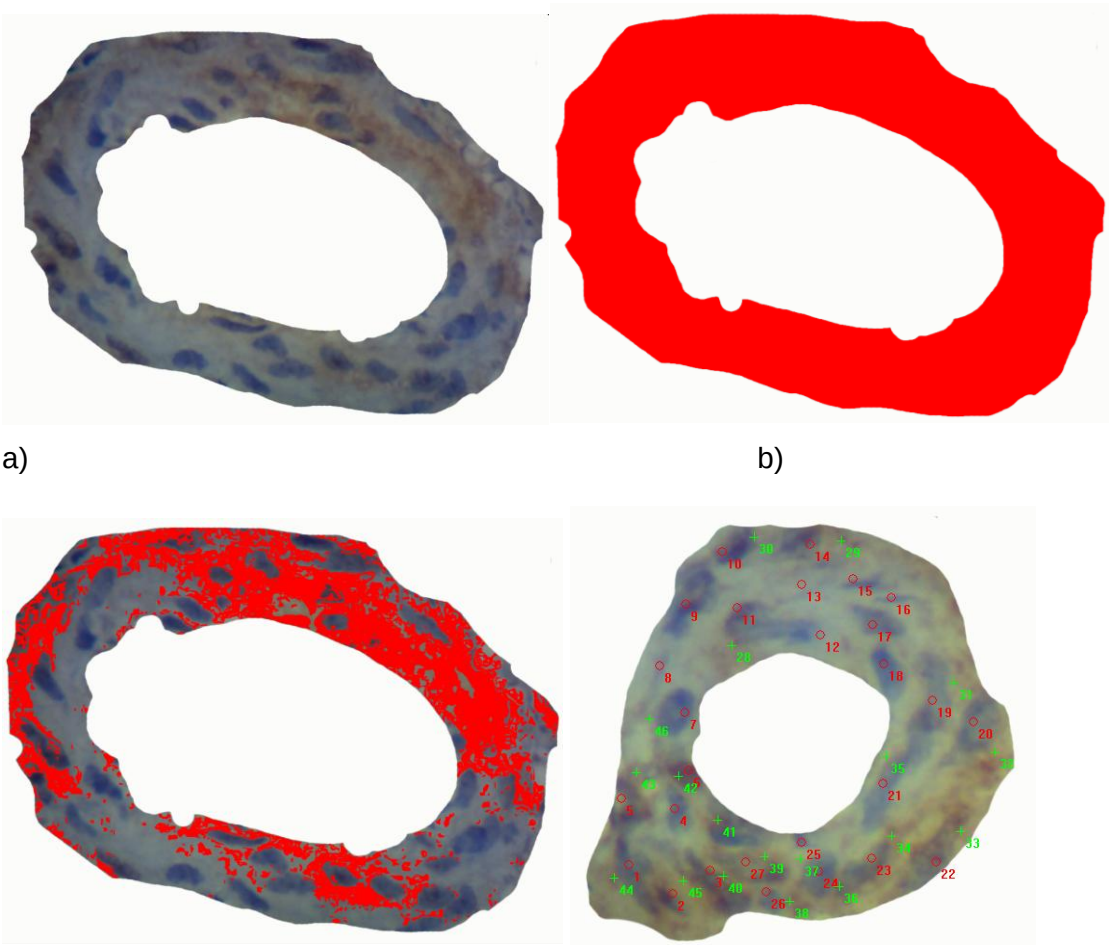
c. d.

a. Arteriola pulmonar de pollo expuesto a normoxia relativa. b. c. Arteriola pulmonar de pollo expuesto a hipoxia hipobárica con IHQ positiva a ET-1 en la túnica muscular. d. Arteriola pulmonar de pollo expuesto a hipoxia hipobárica sin HAP (sano). Ampliación 40x.

En el análisis morfométrico de la expresión de la proteína ET-1 (Figura 3-7), al comparar las mediciones de las variables porcentaje de células positivas a la IHQ de ET-1 y del porcentaje de área de la túnica muscular con marcación positiva se encontró mayor expresión de la ET-1 en las células musculares lisas de arterias pulmonares en los pollos expuestos a hipoxia hipobárica comparados con los mantenidos en normoxia relativa

(p<0.001) (Figura 3-8), cuando se relacionaron estas dos variables, se encontró un alta asociación directa con una correlación de Pearson r=0.954 (P <0,000).

Figura 3-7. Análisis morfométrico de la IHQ de ET-1 en arteriolas pulmonares de pollos.

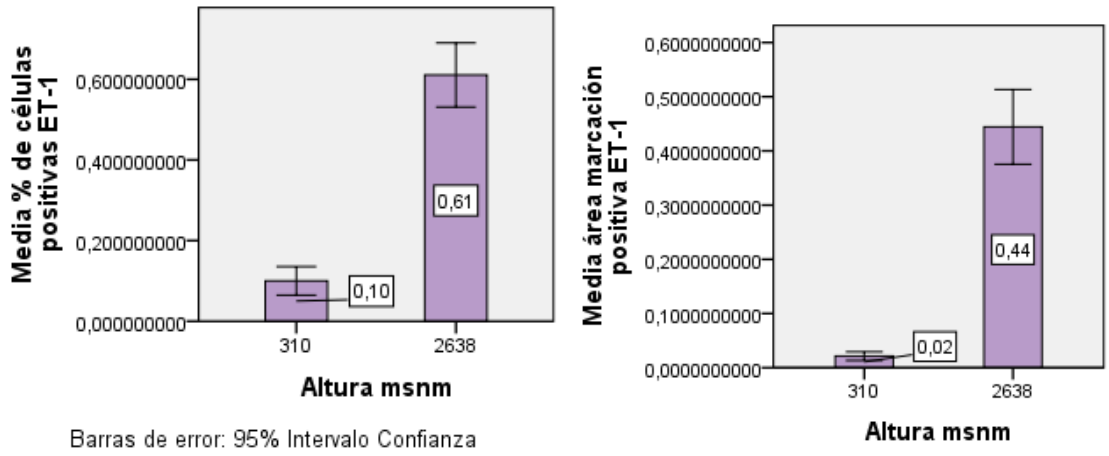


a) b)

c) d)

a) Túnica muscular de la arteriola pulmonar. b) Medición del área total (μm^2) de la túnica media muscular. c) Medición de la marcación positiva a la IHQ de ET-1(área μm^2) d). Recuento del número de células musculares lisas (rojo) y número de células positivas a la IHQ de ET-1 (verde).

Figura 3-8. Expresión de la proteína ET-1 en pollos de engorde expuestos a hipoxia hipobárica natural.



a. **b.**

a. Porcentaje de células con marcación positiva. b. Área de marcación positiva expresada en porcentaje. Medias diferentes p<0,01.

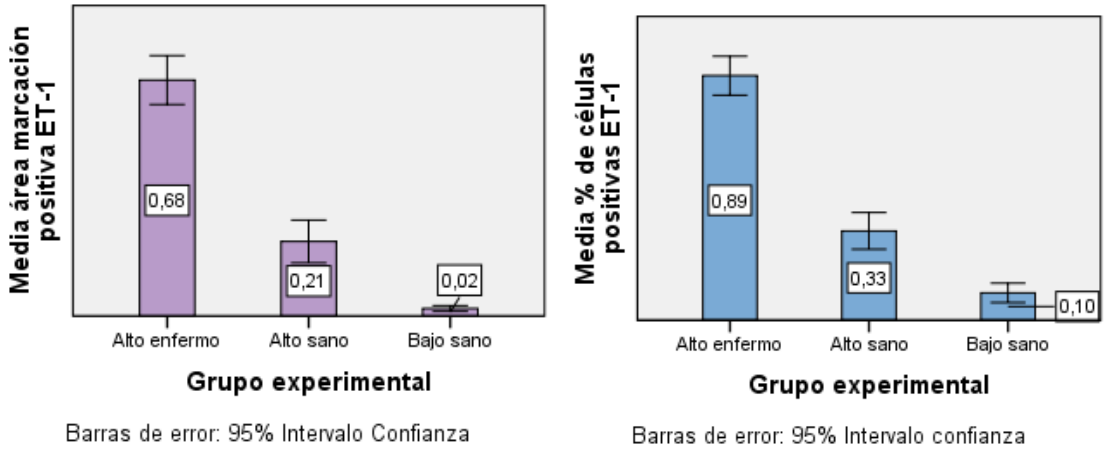
Las aves de la altura se clasificaron según el índice cardiaco (Areiza, 2011) y se compararon las medias de las variables (Tabla 3-6), lo que resultó en una mayor expresión de la proteína ET-1 en las arterias y arteriolas pulmonares de los animales expuestos a hipoxia hipobárica y enfermos con HAP, un valor medio de expresión de la proteína en los pollos expuestos a la hipoxia hipobárica pero que no evidenciaban hallazgos compatibles con HAP (sanos) y una expresión de la proteína ET-1 mínima o basal en los pollos en condiciones de normoxia relativa (Figura 3-9).

Tabla 3-6. Valores del índice cardiaco y expresión de ET-1 en pollos según el grupo experimental

	Alto enfermo	Alto sano	Bajo sano
Aves	4	4	4
Índice cardiaco (IC)	$44{,}2\pm2{,}6_a$	$16{,}3\pm1{,}0_b$	$15{,}3\pm0{,}5_b$
Arterias	40	40	40
% de células positivas ET-1	$0{,}89\pm{,}22_a$	$0{,}32\pm{,}21_b$	$0{,}10\pm0{,}11_c$
% de área marcación positiva ET-1	$0{,}74\pm{,}23_a$	$0{,}21\pm{,}19_b$	$0{,}02\pm0{,}02_c$

a, b, c. Valores significativamente diferentes en p< 0.01, Comparación de medias de Scheffé

Figura 3-9. Expresión de la proteína ET-1 en pollos de engorde según el grupo experimental.



a. Porcentaje de células con marcación positiva. b. Área de marcación positiva expresada en porcentaje. Medias diferentes p<0,01

3.5 Discusión

En el presente trabajo se ratificó que la hipoxia hipobárica fue la causa de HAP en pollos de engorde, al igual que en trabajos similares (Cueva *et al*, 1974; Marín, 1980; Villaseñor, 1980; Useche *et al*, 1981; López, 1982; Hernández, 1987; Maxwell *et al,* 1990; Arce, 1998).

La IHQ para ETA y eNOS no funcionó posiblemente por la especificidad de los anticuerpos primarios, teniendo en cuenta que los antígenos utilizados en la producción de estos eran péptidos sintéticos de origen humano, además se relaciona con lo expuesto por Levin (1998) sobre la estructura altamente conservada de los receptores (ETA) en especies de mamíferos (85-90%).

La exposición a la hipoxia no tuvo influencia sobre el peso corporal (p=0,171), pero se evidenció una variabilidad en el peso de los pollos criados en altura probablemente a que algunas aves se encontraban en un proceso patológico por HAP, ya sea en estadios subclínicos o clínicos lo cual afecta su normal crecimiento.

En los animales expuestos a hipoxia hipobárica hubo pollos de engorde sanos y enfermos con HAP, los enfermos se clasificaron por tener IC>26, pero al mismo tiempo presentaron mortalidad espontánea, depresión, hidropericardio, ascitis, corazón redondeado, congestión pulmonar, hepatomegalia, lo que confirma la utilidad del índice cardiaco (IC) para diagnosticar la HAP, similar a planteado por Gómez (2007), Areiza *et al* (2011), Vásquez y Hernández (2012) para las condiciones propias del altiplano de Cundinamarca y Boyacá.

Los valores de IC en los pollos bajo condiciones de normoxia relativa fueron menores de 22, lo cual se considera normal e indica que la fisiología respiratoria y la circulación menor se encuentra en equilibrio. En cuanto a los pollos expuestos a la hipoxia hipobárica se pueden dividir en dos grupos, los sanos y los enfermos por HAP, en el primero hubo animales que no se enfermaron, tuvieron desarrollo y crecimiento normal y estos tuvieron menor expresión de la proteína ET-1 y un tamaño de corazón normal (IC<25) similar a los pollos mantenidos en baja altura, entonces en estos pollos a pesar de la exposición a la hipoxia los mecanismos de compensación son suficientes para mantener el equilibrio en la fisiología pulmonar y cardiaca, finalmente estos son los pollos con mecanismos de adaptación y resistencia a las condiciones medioambientales de la altura.

El grupo de los pollos enfermos con HAP, presentaron sintomatología clínica, incremento en la masa del ventrículo derecho expresado como IC mayores a 26, en estos animales la hipoxia es un estímulo fuerte que causa disfunción endotelial y en donde se activan los mecanismos de compensación pero se superan los límites fisiológicos y se convierte en un problema patológico con HAP; por lo tanto hay diferencias individuales en la susceptibilidad o reactividad para el desarrollo de la HAP en pollos de engorde, similar a lo planteado por Hernández, (1982) y Huchzemeyer *et al,* (1988).

Por otro lado, los pollos enfermos con HAP y los que murieron durante el experimento por HAP tuvieron de valores de IC entre 26.3-47.6 y 19.0-53.9 respectivamente, lo cual muestra una alta variabilidad dentro del grupo de los pollos enfermos, entonces se puede plantear que la presentación de la HAP es diferente en cada individuo, que no hay un orden o secuencia en la manifestación de la enfermedad y que el valor del IC no tiene

relación con la mortalidad de los pollos, similar a lo expuesto por Pulido (1996); por lo todo lo anterior se podría suponer la susceptibilidad o predisposición individual determinaría los límites entre la compensación de la hipoxia, el desarrollo de la HAP (cuadro agudo o crónico) y la muerte de los animales.

La hipoxia es uno de los estímulos que produce activación de las células endoteliales (Dore-Duffy *et al*, 1999; Budhiraja *et al,* 2004; Pak *et al,* 2007), cuando el estímulo supera los límites fisiológicos de homeostasis se produce disfunción endotelial y aumento de la presión arterial en individuos susceptibles, lo cual genera una producción exagerada de ET-1 en las células endoteliales que va a migrar a las túnica media vascular en las células musculares lisas en las cuales activa la vía de la Ca^{2+}- calmodulina y las proteínas quinasas que finalmente conllevan a la contracción de la célula muscular lisa y en general de la arteria pulmonar y a los cambios en la estructura del vaso sanguíneo.

La ET-1 tuvo una mayor expresión en la túnica media muscular de las arterias pulmonares en los pollos criados en la altura por efecto de la hipoxia hipobárica, la cual es un estímulo químico que puede regular la expresión genética de ET-1 (López-Jaramillo, 1998), similar a lo reportado por Giaid et al (1993) quien reportó expresión alta de ET-1 en arterias pulmonares particularmente en la túnica elástica y muscular de humanos con Hipertensión pulmonar por medio de la inmunohistoquímica.

La expresión de la proteína ET-1 está aumentada en pollos enfermos con HAP comparado con animales sanos, similar a lo encontrado por Gómez *et al,* 2007 quien reportó un aumento en la expresión del mRNA de ET-1 en pollos enfermos con HAP, la mayor expresión de ET-1 en los pollos enfermos con HAP genera vasoconstricción pulmonar, proliferación de células musculares lisas y trombosis *in situ* (Coggins & Blotch, 2007), aumento en el grosor de la adventicia, que genera la remodelación de la pared vascular (Pak *et al,* 2007) de las arterias pulmonares lo que produce un estrechamiento en el lumen y aumenta la resistencia en el flujo vascular pulmonar procedente del corazón que finalmente genera mayor gasto cardiaco, hipertrofia y dilatación cardiaca derecha lo que se puede revelar en la medición del IC.

Los pollos enfermos por HAP tuvieron mayor expresión de la proteína ET-1 ($p<0.01$), lo cual tiene una asociación directa con los valores del IC, correlación de Pearson $r=0.83$ ($p<0,001$), lo que supone que la mayor expresión de ET-1 tiene una relación directa con la presentación de HAP, debido a que hipoxia estimula la producción de sustancias vasoactivas en las arterias pulmonares como la ET-1 con su potente efecto vasoconstrictor.

Varias moléculas han sido estudiadas en la patogénesis de la hipertensión pulmonar. La serotonina (Launay *et al,* 2002), Los receptores ETA y ETB de la ET-1 (Li *et al*., 1994; Balyakina *et al*., 2002; Gómez *et al*., 2007; Gómez *et al*., 2008), la sintasa de óxido nítrico (Stenmark and Mecham, 1997; Moreno de Sandino and Hernandez, 2003; Moreno de Sandino and Hernandez, 2006; Gómez *et al*., 2007), el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) y la Adrenomudulina (AM) (Gómez *et al*., 2007), el tromboxano (Wideman *et al*., 1999); sin embargo, la mayor expresión del mRNA y de la proteína ET-1 en pollos de engorde sometidos a hipoxia hipobárica, así como, la mayor expresión en los pollos enfermos comparados con los sanos expuestos a hipoxia hipobárica se puede suponer que la ET-1 juega un papel fundamental en la susceptibilidad individual a contraer HAP y sería clave en la adaptación de los pollos de engorde a las condiciones ambientales de hipoxia (altura), por lo tanto podríamos sugerir a la ET-1 como la molécula de mayor importancia en la patogénesis de la HAP por hipoxia hipobárica.

3.6 Bibliografía

1. Alexander AF., Jensen, R. 1959. Gross cardiac changes in cattle with high mountain disease and in experimental cattle maintained at high altitudes. Am J Vet Res 20: 680 – 689.
2. Arce, M.J. 1998. El efecto del medio ambiente sobre la presencia del síndrome ascítico en el pollo de engorde. Vet. Méx. 29(3): 221 – 225.
3. Areiza, R.A., Rivas, P.C., Hernández, A. 2011. A Quantitative Study of the Pulmonary Vascular Bed and Pulmonary Weight : Body Weight Ratio in Chickens Exposed to Relative Normoxia and Chronic Hypobaric Hypoxia. J poult sci. 48(4): 267-274.
4. Balyakina, EV., Chen, D., Lawrence, ML., Manning, S., Parker, RE., Shappell., SB., and Meyrick, B. ET-1 receptor expression and distribution in L1 and L2 cells from hypertensive sheep pulmonary atery. Am J Physiol Cell Mol Physiol 283: L42-51, 2002.
5. Beaver, B. V. *et al*. (2001). JAVMA, Vol 218, No. 5, March 1, 669-696.
6. Bottje, W.G.; Wideman, R.F. 1995. Potential role of free radicals in the pathogenesi s of pulmonary hypertension syndrome. Poultry and Avian Biology Reviews, 6, 211-231.

7. Bouallegue, A., G. B. Daou, y A. K. Srivastava. 2007. Endothelin-1-induced signaling pathways in vascular smooth muscle cells. Curr Vasc Pharmacol 5:45-52.
8. Boulanger, C., y T. F. Luscher. 1990. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. J Clin Invest 85:587-590.
9. Budhiraja, R., R. M. Tuder, y P. M. Hassoun. 2004. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. Circulation 109:159-165. Burton, R. R., y A. H. Smith. 1967. Effect of polycythemia and chronic hypoxia on heart mass in the chicken. J Appl Physiol 22:782-785.
10. Chicken Farmers of Canada 2004. Chicken Data Guide 2004. http://www.chicken.ca/app/DocRepository/1/Data_Handbook/2004_Data_Booklet.pdf
11. Coggins M, Bloch K. Nitric Oxide in the Pulmonary Vasculature. 2007 Arterioscler Thromb Vasc Bio.;27:1877-1885.
12. Cueva, S., H. Sillau, A. Valenzuela, y H. Ploog. 1974. High altitude induced pulmonary hypertension and right heart failure in broiler chickens. Res Vet Sci 16:370-374.
13. Daneshyar M, Kermanshahi H, and Golian A. 2009. Changes of biochemical parameters and enzyme activities in broiler chickens with cold-induced ascites. Poultry Science 88:106–110
14. Dore-Duffy P., Balabanov R., Beaumont T., Hritz M. A., Harik S.I., and LaManna J.C.. 1999. Endothelial Activation Following Prolonged Hypobaric Hypoxia. Microvascular Research 57, 75–85 (1999)
15. Emori T, Hirata Y, Imai T, Eguchi S, Kanno K, et al. 1993. Cellular mechanism of natriuretic peptides induced inhibition of endothelin 1 biosynthesis in rat endothelial cells. Endocrinology 133: 2474-2480.
16. Faller, D. V. 1999. Endothelial cell responses to hypoxic stress. Clin Exp Pharmacol Physiol 26:74-84.
17. Fukami, K. 2002. Structure, regulation, and function of phospholipase C isozymes. J Biochem 131:293-299.
18. Giaid A., Yanagisawa M., Langkeben D., Michel R., Levy R., Shenib H., Kimura S., Masaki T., Duguid W., Path F., Stewart D.1993. Expression of endothelin 1 en the lungs of patients with pulmonary hypertension. N Engl J Med, 328; 1732-9.
19. Guo, J. L., Q. H. Zheng, Q. Q. Yin, W. Cheng, and Y. B. Jiang.2007. Study on mechanism of ascites syndrome of broilers. Am. J. Anim. Vet. Sci. 2:62–65.
20. Gómez AP, Moreno MJ, Iglesias A, Coral PX, Hernández A. 2007. Endothelin 1, its endothelin Type A Receptor, Connective Tissue Growth Factor, Platelet-Derived Growth Factor, and Adrenomedullin Expression in Lungs of Pulmonary Hypertensive and Nonhypertensive Chickens. Poultry Science 86:909–916.
21. Gómez A. P., Moreno M. J., Baldrich R. M., Hernández A. 2008. Endothelin-1 Molecular Ribonucleic Acid Expression in Pulmonary Hypertensive and Nonhypertensive Chickens. Poultry Science 87:1395–1401.
22. Goto K, Hama H, Kasuya Y. 1996. Molecular pharmacology and pathophysiological significance of endothelin. Jpn. J. Pharmacol. 72, 261-290.
23. Hernández, A. 1982. Influencia de la altitud, la raza, el nivel energético de la ración y el sexo en la presentación de la ascitis de origen hipóxico en pollos de engorde. Rev. Fac. Med. Vet. Zoot. 10:39 - 41.
24. Hernández, A. 1984. Disminución de la incidencia de la ascitis aviar de origen hipóxico en elincremento de la temperatura en los galpones. XIV Cong. Nal. de Med. Vet. y Zoot. Cartagena. Memorias p. 6.
25. Huchermeyer, A.M.; De Ruyck, A.M.C.; Ark. V. 1988. Broiler pulmonary hypertension syndrome. III commercial broiler strains differ in their susceptibility. Onderstepoort J Vet Res. 55: 5-9.
26. Imai T, Hirata Y, Emori T, Yanagisawa M, Masaki T, Marumo F. 1992. Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells. Hypertension 19; 753-757.
27. Inagami, T., M. Naruse, y R. Hoover. 1995. Endothelium as an endocrine organ. Annu Rev Physiol 57:171-189.

28. Inoue, A., M. Yanagisawa, S. Kimura, Y. Kasuya, T. Miyauchi, K. Goto, y T. Masaki. 1989. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. Proc Natl Acad Sci U S A 86:2863-2867.
29. Launay J., Herv P., Peoc'h K., Tournois C, Callebert J., Negibil C., Etienne N, Drouet L., Humber M., Simonneau G., Maroteaux L. 2002. Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. Nature Medicine. Volumen 5. Number 5, 1129-1135.
30. Lerman A, Edwards BS, Hallett JW, Heublein DM, Sondberg SM, et al. 1991. Circulating and tissue endothelin inmunoreactivity in advanced atherosclerosis. N. Engl. J. Med. 325: 997-1001.
31. Levin E.R.. 1995. Endothelins. New. Eng. J. Med. Vol. 333 No. 6: 356– 363
32. Li H., Chen SJ., Chen YF., Meng QC., Durand J., Oparil S., and Elton TS. Enhanced endothelin-1 and endothelin receptor gene expression in chronic hypoxia. J. Appl. Physiol. 77:1451-1459, 1994.
33. López-Jaramillo, P. 1998. Bioquimica del endotelio vascular: Implicaciones fisiologicas y clinicas. Capitulos 2, 3, 4, 5, 8,10. ed. Univalle, Colombia.
34. López-Coello,C, Casas LC, Paasch ML. 1982. Efecto de la altura sobre la presentación del síndrome ascítico. Memorias de la Reunion de Investigacion Pecuaria en Mexico. Mexico DF 1982, 214-217. Fac de Med. Vet, y Zoot. UNAM. Mexico
35. Marsden, P. A., y B. M. Brenner. 1992. Transcriptional regulation of the endothelin-1 gene by TNF-alpha. Am J Physiol 262:C854-861.
36. Mauban, J. R., C. V. Remillard, y J. X. Yuan. 2005. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: role of ion channels. J Appl Physiol 98:415-420.
37. Maxwell, M.H.; Spence, S.; Robertson, G.; Mitchell, M.A. 1990. Hematological and morphological responses of broiler chicks to hypoxia. Avian Pathol. 19: 23 – 40.
38. Maxwell, M. H., and G. W. Robertson. 1997. World broiler ascites survey. Poult. Int. 36:16–30.
39. Mejía, G. 1982. Influencia del frío en la incidencia de la ascitis de orígen hoipóxico en pollos de engorde. Medicina Veterinaria. Universidad Nacional. Bogotá.
40. Mihatsch MJ, Bach JF, Coovadia HF, Forre O, Moutsopoulus HM, et al. 1988. Cyclosporin-associated nephropathy in patients with autoimmune diseases. Klin. Wochenschr. 66:43-47.
41. Mombouli, J. V., y P. M. Vanhoutte. 1999. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. J Mol Cell Cardiol 31:61-74.
42. Moreno de Sandino, M., y A. Hernández. 2006. Pulmonary arteriole remodeling in hypoxic broilers expressing different amounts of endothelial nitric oxide synthase. Poult Sci 85:899- 901.
43. Moreno de Sandino, M., y A. Hernández. 2003. Nitric oxide synthase expression in the endothelium of pulmonary arterioles in normal and pulmonary hypertensive chickens subjected to chronic hypobaric hypoxia. Avian Dis 47:1291-1297.
44. Pak, O., A. Aldashev, D. Welsh, y A. Peacock. 2007. The effects of hypoxia on the cells of the pulmonary vasculature. Eur Respir J 30:364-372.
45. Pan, J. Q.; Tan, X.; Li, J. C.; Sun, W. D.; Wang, X. L. 2005. Effects of early feed restriction and cold temperature on lipid peroxidation, pulmonary vascular remodelling and ascites morbidity in broilers under normal and cold temperature. British Poult. Sci . 46 (3): 374–381.
46. Pierce, K. L., R. T. Premont, y R. J. Lefkowitz. 2002. Seven-transmembrane receptors. Nat Rev Mol Cell Biol 3:639-650.
47. Pulido, M. Ascitis aviar de orígen hipóxico: evaluación del daño cardíaco mediante la técnica electrocardiográfica y las posibles relaciones con los valores del índice cardíaco, hematocrito y hemoglobina. Tesis de M.Sc. Universidad Nacional. Bogotá, 1996.
48. Rengifo, L.J. 1979. Poliserositis en pollos barrilleros (Bolsa de agua). En: Congreso Latinoamericano de Avicultura, 6º. Anales. Ivita. P. 32 – 38.
49. Seo BG, Tschudl MR, Lûscher TF. 1994. Both ETA and ETB receptors mediate endothelin-induced contraction in human blood vessels. J. Hypertens. 12 (Suppl. 3): S127.
50. Simonson MS, Herman WH. Protein kinase C and protein tyrosine kinase activity contribute to mitogenic signaling by endothelin-1: cross-talk between G protein-coupled receptors and pp60c-src. J Biol Chem 1993;268: 9347-57.
51. Stenmark K.R., & Mecham R.P. Cellular and Molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling. Annu Rev Physiol. 1997. vol. 59. p. 89-144.

52. Vásquez, I.C., Hernández, A. 2012. Hipertensión pulmonar en pollos, lapso de exposición a la hipoxia hipobárica y relación peso pulmonar: peso corporal, bajo condiciones de temperatura controlada. Rev. Colomb. Cienc. Pecu. 25: 81-89
53. Wideman RFJr., Maynard P., and Bottje W. Thromboxane mimics the pulmonary but not systemic vascular responses to bolus HCl injections in broiler chickens. Poult. Sci. 78:714–721, 1999.
54. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe S, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto k, Masaki T. 1988. A novel potent vasoconstrictorm peptide produced by vascular endotelial cell. Nature. Vol 332, 31 march. 411:415.

4. Conclusiones

4.1 Conclusiones

La altura sobre el nivel de mar tiene un efecto directo sobre el comportamiento productivo y la salud de los pollos de engorde, se observó mayor índice cardiaco en los pollos de engorde criados a 2638 m.s.n.m.; Se ratifica que la hipoxia hipobárica fue la causa de HAP en pollos de engorde, la ascitis sólo es un signo de HAP y puede no encontrarse en la fase aguda de la enfermedad y el hidropericardio es un hallazgo a la necropsia muy concluyente de la presencia de HAP, así mismo, el tiempo de exposición a la hipoxia hipobárica no influye sobre la forma de presentación y no afecta la manifestación de la enfermedad y se puede deducir que la susceptibilidad a la muerte por causa de HAP se debe a un factor individual de adaptación.

En los animales expuestos a hipoxia hipobárica hubo pollos de engorde sanos y enfermos con HAP, los enfermos se clasificaron por tener IC>26, pero al mismo tiempo presentaron mortalidad espontánea, depresión, hidropericardio, ascitis, corazón redondeado, congestión pulmonar, hepatomegalia, lo que confirma la utilidad del índice cardiaco (IC) para diagnosticar la HAP,

En cuanto a los pollos expuestos a la hipoxia hipobárica se pueden dividir en dos grupos, los sanos y los enfermos por HAP, por lo tanto hay diferencias individuales en la susceptibilidad o reactividad para el desarrollo de la HAP en pollos de engorde.

Por otro lado, los pollos enfermos con HAP y los que murieron durante el experimento por HAP tuvieron de valores de IC entre 26.3-47.6 y 19.0-53.9 respectivamente, lo cual muestra una alta variabilidad dentro del grupo de los pollos enfermos, entonces se puede plantear que la presentación de la HAP es diferente en cada individuo, que no hay un orden o secuencia en la manifestación de la enfermedad y que el valor del IC no tiene

relación con la mortalidad de los pollos, se podría suponer la susceptibilidad o predisposición individual determinaría los límites entre la compensación de la hipoxia, el desarrollo de la HAP (cuadro agudo o crónico) y la muerte de los animales.

La ET-1 tuvo una mayor expresión en la túnica media muscular de las arterias pulmonares en los pollos criados en la altura por efecto de la hipoxia hipobárica,

Los pollos enfermos por HAP tuvieron mayor expresión de la proteína ET-1 comparado con animales sanos ($p<0.01$), lo cual tiene una asociación directa con los valores del IC, correlación de Pearson $r=0.83$ ($p<0,001$), lo que supone que la mayor expresión de ET-1 tiene una relación directa con la presentación de HAP.

La mayor expresión del mRNA y de la proteína ET-1 en pollos de engorde sometidos a hipoxia hipobárica, así como, la mayor expresión en los pollos enfermos comparados con los sanos expuestos a hipoxia hipobárica se puede suponer que la ET-1 juega un papel fundamental en la susceptibilidad individual a contraer HAP y sería clave en la adaptación de los pollos de engorde a las condiciones ambientales de hipoxia (altura), por lo tanto podríamos sugerir a la ET-1 como la molécula de mayor importancia en la patogénesis de la HAP por hipoxia hipobárica.

La IHQ para ETA y eNOS no funcionó posiblemente por la especificidad de los anticuerpos primarios,

Bibliografía

1. Adnot S., Raffestin B., Eddhahibi S., Braquet P., Chabrier P. Loss of endothelium-dependent relaxant activity in the pulmonary circulation of rats exposed to chronic hypoxia.J.Clin.Invest. 87: 155-162, 1991.
2. Adnot, S., B. Raffestin, y S. Eddahibi. 1996. Nitric oxide in the pulmonary circulation. Monaldi Arch Chest Dis 51:519-527.
3. Alexander AF., Jensen, R. 1959. Gross cardiac changes in cattle with high mountain disease and in experimental cattle maintained at high altitudes. Am J Vet Res 20: 680 – 689.
4. Anthony, N.P., J.M. Balog, F.B. Staudinger, C.W. Wall, R.O. Walker, and W.E. Huff. 1994. Effect oral urease inhibitor and ceiling fans on ascites in broilers. I. Environmental variability and incidence of ascites. Poult Sci 73:801-809.
5. Arce, M.J. 1998. El efecto del medio ambiente sobre la presencia del síndrome ascítico en el pollo de engorde. *Vet. Méx.* 29(3): 221 – 225.
6. Areiza, R.A., Rivas, P.C., Hernández, A. 2011. A Quantitative Study of the Pulmonary Vascular Bed and Pulmonary Weight : Body Weight Ratio in Chickens Exposed to Relative Normoxia and Chronic Hypobaric Hypoxia. J poult sci. 48(4): 267-274.
7. Balog,J.M., N.B. Anthony, C.W.Wall, R.O. Walker, N.C. Rath, and W.E. Huff. 1994.E ffect of a urease inhibitor and ceiling fans on ascites in broilers. 2. Blood variables, ascites scores, and body and organ weights. Poult Sci 73:810-816.
8. Balyakina, EV., Chen, D., Lawrence, ML., Manning, S., Parker, RE., Shappell., SB., and Meyrick, B. ET-1 receptor expression and distribution in L1 and L2 cells from hypertensive sheep pulmonary atery. Am J Physiol Cell Mol Physiol 283: L42-51, 2002.
9. Beaver, B. V. *et al*. (2001). JAVMA, Vol 218, No. 5, March 1, 669-696.
10. Bogdan C. Nitric oxide and the regulation of gene expression. 2001. TRENDS in Cell Biology Vol.11 No.2 February; 66-75.
11. Bottje, W.G.; Wideman, R.F. 1995. Potential role of free radicals in the pathogenesi s of pulmonary hypertension syndrome. *Poultry and Avian Biology Reviews, 6*, 211-231.
12. Bouallegue, A., G. B. Daou, y A. K. Srivastava. 2007. Endothelin-1-induced signaling pathways in vascular smooth muscle cells. Curr Vasc Pharmacol 5:45-52.
13. Boulanger, C., y T. F. Luscher. 1990. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. J Clin Invest 85:587-590.
14. Budhiraja, R., R. M. Tuder, y P. M. Hassoun. 2004. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. Circulation 109:159-165. Burton, R. R., y A. H. Smith. 1967. Effect of

polycythemia and chronic hypoxia on heart mass in the chicken. J Appl Physiol 22:782-785.

15. Burton RR., Smith AH. Effect of policytemia and chronic hypoxia on heart mass in the chicken. J. Appl. Physiol. 22 (15): 782-785, 1967.
16. Cardenas, D.; Hernández, A.; Osuna, O. 1985. Algunos valores hematimétricos y de proteínas totales en pollos Arbor Acres sanos y ascíticos en la Sabana de Bogotá. *Rev*. ACOVEZ. 9:42 -.44.
17. Chicken Farmers of Canada 2004. Chicken Data Guide 2004. http://www.chicken.ca/app/DocRepository/1/Data_Handbook/2004_Data_Booklet.pdf
18. Choi, K., M. Kennedy, A. Kazarov, J. C. Papadimitriou, y G. Keller. 1998. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. Development 125:725-732.
19. Coggins M, Bloch K. Nitric Oxide in the Pulmonary Vasculature. 2007 *Arterioscler Thromb Vasc Bio.*;27:1877-1885.
20. Cueva, S., H. Sillau, A. Valenzuela, y H. Ploog. 1974. High altitude induced pulmonary hypertension and right heart failure in broiler chickens. Res Vet Sci 16:370-374.
21. Moreno, M.J. y A. Hernandez. 1996. La Hipertension Pulmonar en Pollos de Engorde. Patogenesis, Control y Perspectivas de Investigacion. Rev del CEISA (Centro de Investigacion en Salud y Produccion Animal) 3: 65-85.
22. Daneshyar M, Kermanshahi H, and Golian A. 2009. Changes of biochemical parameters and enzyme activities in broiler chickens with cold-induced ascites. Poultry Science 88:106–110
23. Dinh-Xuan, A. T., J. Pepke-Zaba, A. Y. Butt, G. Cremona, y T. W. Higenbottam. 1993. Impairment of pulmonary-artery endothelium-dependent relaxation in chronic obstructive lung disease is not due to dysfunction of endothelial cell membrane receptors nor to L-arginine deficiency. Br J Pharmacol 109:587-591.
24. P. Dore-Duffy, R. Balabanov, T Beaumont, M. A. Hritz, S.I. Harik, and J.C. LaManna. 1999. Endothelial Activation Following Prolonged Hypobaric Hypoxia. Microvascular Research 57, 75–85 (1999)
25. Druyan S., Shlosberg A. and Cahaner A. 2007. Evaluation of Growth Rate, Body Weight, Heart Rate, and Blood Parameters as Potential Indicators for Selection Against Susceptibility to the Ascites Syndrome in Young Broilers. Poultry Science 86:621–629
26. Druyan S., Shinder D., Shlosberg A., Cahaner A. and Yahav S. 2009. Physiological parameters in broiler lines divergently selected for the incidence of ascites. Poultry Science 88:1984–1990.

27. Durmowicz, A. G., y K. R. Stenmark. 1999. Mechanisms of structural remodeling in chronic pulmonary hypertension. Pediatr Rev 20:e91-e102.
28. Emori T, Hirata Y, Imai T, Eguchi S, Kanno K, et al. 1993. Cellular mechanism of natriuretic peptides induced inhibition of endothelin 1 biosynthesis in rat endothelial cells. Endocrinology 133: 2474-2480.
29. Faller, D. V. 1999. Endothelial cell responses to hypoxic stress. Clin Exp Pharmacol Physiol 26:74-84.
30. Fukami, K. 2002. Structure, regulation, and function of phospholipase C isozymes. J Biochem 131:293-299.
31. Furchgott R. F. and Zawadzki JV. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373 – 376.
32. Guo, J. L., Q. H. Zheng, Q. Q. Yin, W. Cheng, and Y. B. Jiang.2007. Study on mechanism of ascites syndrome of broilers. Am. J. Anim. Vet. Sci. 2:62–65.
33. Gómez AP, Moreno MJ, Iglesias A, Coral PX, Hernández A. 2007. Endothelin 1, its endothelin Type A Receptor, Connective Tissue Growth Factor, Platelet-Derived Growth Factor, and Adrenomedullin Expression in Lungs of Pulmonary Hypertensive and Nonhypertensive Chickens. Poultry Science 86:909–916.
34. Gómez A. P., Moreno M. J., Baldrich R. M., Hernández A. 2008. Endothelin-1 Molecular Ribonucleic Acid Expression in Pulmonary Hypertensive and Nonhypertensive Chickens. Poultry Science 87:1395–1401.
35. Gómez A.P. 2008. Tesis de Docotorado en Ciencias de La Salud Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
36. Goto K, Hama H, Kasuya Y. 1996. Molecular pharmacology and pathophysiological significance of endothelin. Jpn. J. Pharmacol. 72, 261-290.
37. Galley, H. F., y N. R. Webster. 2004. Physiology of the endothelium. Br J Anaesth 93:105-113.
38. Guzmán, L, Sandino de M, Hernández, A. 2001.Hipertensión arterial pulmonar en pollos de engorde inoculados experimentalmente con mycoplasma gallisepticum. Rev Col Cienc Pec 14 (supl):55.
39. Giaid A., Yanagisawa M., Langkeben D., Michel R., Levy R., Shenib H., Kimura S., Masaki T., Duguid W., Path F., Stewart D.1993. Expression of endothelin 1 en the lungs of patients with pulmonary hypertension. N Engl J Med, 328; 1732-9.
40. Gonzales E, Buyse J, Sayuri T, Sartori J, Decuypere E. Metabolic Disturbances in Male Broilers of Different Strains. 1. Performance, Mortality, and Right Ventricular Hypertrophy. 1998 Poultry Science 77:1646–1653

41. Hernández, A. 1979. Comprobación de un síndrome ascítico de origen hipóxico (un tipo de edema aviar) en Bogotá. *Rev*. ACOVEZ. 3(11):52 - 54.
42. Hernández, A. 1982. Influencia de la altitud, la raza, el nivel energético de la ración y el sexo en la presentación de la ascitis de origen hipóxico en pollos de engorde. *Rev. Fac. Med. Vet. Zoot*. 10:39 - 41.
43. Hernández, A. 1984. Disminución de la incidencia de la ascitis aviar de origen hipóxico en elincremento de la temperatura en los galpones. XIV Cong. Nal. de Med. Vet. y Zoot. Cartagena. Memorias p. 6.
44. Hernández, A. 1987. Ascites in broilers: a review of several studies done in Colombia. *Avian Dis.* 31:658-661.
45. Holden, W. E., y E. McCall. 1984. Hypoxia-induced contractions of porcine pulmonary artery strips depend on intact endothelium. Exp Lung Res 7:101-112.
46. Huchermeyer, A.M.; De Ruyck, A.M.C.; Ark. V. 1988. Broiler pulmonary hypertension syndrome. III commercial broiler strains differ in their susceptibility. *Onderstepoort J Vet Res.* 55: 5-9.
47. Hassoun, P. M., B. T. Thompson, D. Steigman, y C. A. Hales. 1989. Effect of heparin and warfarin on chronic hypoxic pulmonary hypertension and vascular remodeling in the guinea pig. Am Rev Respir Dis 139:763-768.
48. Hung, A.,; Cueva, S.; Sillau, H. 1973. Observaciones sobre el peso de las porciones cardíacas y la hematología de la gallina de guinea en la altura y a nivel del mar. *Revista de Investigaciones Pecuarias Ivitas*. 2(1): 49-55.
49. Imai T, Hirata Y, Emori T, Yanagisawa M, Masaki T, Marumo F. 1992. Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells. Hypertension 19; 753-757.
50. Ignarro, L. J. 1989. Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. Faseb J 3:31-36.
51. Ignarro, L. J. 1990. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. Annu Rev Pharmacol Toxicol 30:535-560.
52. Imai T, Hirata Y, Emori T, Yanagisawa M, Masaki T, Marumo F. 1992. Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells. Hypertension 19; 753-757.
53. Inagami, T., M. Naruse, y R. Hoover. 1995. Endothelium as an endocrine organ. Annu Rev Physiol 57:171-189.

54. Inoue, A., M. Yanagisawa, S. Kimura, Y. Kasuya, T. Miyauchi, K. Goto, y T. Masaki. 1989. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. Proc Natl Acad Sci U S A 86:2863-2867.
55. Janssens, S. P., A. Shimouchi, T. Quertermous, D. B. Bloch, y K. D. Bloch. 1992. Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. J Biol Chem 267:14519-14522.
56. Kobzik L, Bredt DS, Lowenstein LC, Drazen J, Gaston B, Sugarbaker D, Stamler JS. 1993. Nitric oxide synthase in human and rat lung: Immunocytochemical and histochemical localization. Am J Respir Cell Mol Biol 9: 371-377.
57. Konishi, M. and Su, C. (1983). Role of endothelium in dilator responses of spontaneously hypertensive rat arteries. Hypertension 5: 881–886.
58. Kurihara, Y., H. Kurihara, H. Suzuki, T. Kodama, K. Maemura, R. Nagai, H. Oda, T. Kuwaki, W. H. Cao, N. Kamada, y et al. 1994. Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. Nature 368:703-710.
59. Kutner, Michael H., Christopher J. Nachtsheim, John Neter and William Li. 2005. Applied linear statistical models. 5th ed. Boston: McGraw-Hill.
60. Lahera, V., E. Cediel, N. de las Heras, S. Vazquez-Perez, D. Sanz-Rosa, B. Vazquez-Cruz, y V. Cachofeiro. 2003. [Endothelial dysfunction in hypertension]. Nefrologia 23 Suppl 4:3-12.
61. Launay J., Herv P., Peoc'h K., Tournois C, Callebert J., Negibil C., Etienne N, Drouet L., Humber M., Simonneau G., Maroteaux L. 2002. Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. Nature Medicine. Volumen 5. Number 5, 1129-1135.
62. Lerman A, Edwards BS, Hallett JW, Heublein DM, Sondberg SM, et al. 1991. Circulating and tissue endothelin inmunoreactivity in advanced atherosclerosis. N. Engl. J. Med. 325: 997-1001.
63. Levin E.R.. 1995. Endothelins. New. Eng. J. Med. Vol. 333 No. 6: 356– 363
64. Li H., Chen SJ., Chen YF., Meng QC., Durand J., Oparil S., and Elton TS. Enhanced endothelin-1 and endothelin receptor gene expression in chronic hypoxia. J. Appl. Physiol. 77:1451-1459, 1994.
65. López-Jaramillo, P. 1998. Bioquimica del endotelio vascular: Implicaciones fisiologicas y clinicas. Capitulos 2, 3, 4, 5, 8,10. ed. Univalle, Colombia.
66. López-Coello,C, Casas LC, Paasch ML. 1982. Efecto de la altura sobre la presentación del síndrome ascítico. Memorias de la Reunion de Investigacion Pecuaria en Mexico. Mexico DF 1982, 214-217. Fac de Med. Vet, y Zoot. UNAM. Mexico

67. Marín, A. 1980. Estudio epidemiológico retrospectivo del edema aviar en Colombia. Tesis M.Sc. Universidad Nacional-ICA. Bogotá, p. 56.
68. Marsden, P. A., y B. M. Brenner. 1992. Transcriptional regulation of the endothelin-1 gene by TNF-alpha. Am J Physiol 262:C854-861.
69. Mauban, J. R., C. V. Remillard, y J. X. Yuan. 2005. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: role of ion channels. J Appl Physiol 98:415-420.
70. McMahon TJ, Ahearn GS, Moya MP, Gow AJ, Huang Y-CT, Luchsinger BP,Nudelman R, Yan Y, Krichman AD, Bashore TM, Califf RM, Singel DJ, Piantadosi CA, Tapson VF, Stamler JS. 2005. A nitric oxide processing defect of red blood cells created by hypoxia: Deficiency of S-nitrosohemoglobin in pulmonary hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A*.;102:14801–14806.
71. Mawji, I. A., y P. A. Marsden. 2003. Perturbations in paracrine control of the circulation: role of the endothelial-derived vasomediators, endothelin-1 and nitric oxide. Microsc Res Tech 60:46-58.
72. Maxwell, M.H.; Spence, S.; Robertson, G.; Mitchell, M.A. 1990. Hematological and morphological responses of broiler chicks to hypoxia. *Avian Pathol*. 19: 23 – 40.
73. Maxwell, M. H., and G. W. Robertson. 1997. World broiler ascites survey. Poult. Int. 36:16–30.
74. Mejía, G. 1982. Influencia del frío en la incidencia de la ascitis de orígen hoipóxico en pollos de engorde. Medicina Veterinaria. Universidad Nacional. Bogotá.Mihatsch MJ, Bach JF, Coovadia HF, Forre O, Moutsopoulus HM, et al. 1988. Cyclosporin-associated nephropathy in patients with autoimmune diseases. Klin. Wochenschr. 66:43-47.
75. Mihatsch MJ, Bach JF, Coovadia HF, Forre O, Moutsopoulus HM, et al. 1988. Cyclosporin-associated nephropathy in patients with autoimmune diseases. Klin. Wochenschr. 66:43-47.
76. Mombouli, J. V., y P. M. Vanhoutte. 1999. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. J Mol Cell Cardiol 31:61-74.
77. Monge Velarde F.S. 2003. El reto fisiológico de vivir en los Andes. 1 ed. IFEA Instituto Francés de Estudios Andinos. p. 435
78. Moncada, S., y A. Higgs. 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. N Engl J Med 329:2002- 2012.
79. Moncada, S., R. M. Palmer, y E. A. Higgs. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev 43:109-142.

80. Moreno, De S.M. 1984. Variación cardiopulmonar y en los valores de hemoglobina y hematocrito durante la hipoxia en pollos comerciales y criollos. Tesis M.Sc. Universidad Nacional. Bogotá.
81. Moreno de Sandino, M. 2004. Posible papel del Óxido Nítrico (NO) en el síndrome de hipertensión pulmonar hipóxica aviar. Tesis de doctorado. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia. Bogota (Colombia).
82. Moreno de Sandino, M., y A. Hernández. 2006. Pulmonary arteriole remodeling in hypoxic broilers expressing different amounts of endothelial nitric oxide synthase. Poult Sci 85:899-901.
83. Moreno de Sandino, M., y A. Hernández. 2003. Nitric oxide synthase expression in the endothelium of pulmonary arterioles in normal and pulmonary hypertensive chickens subjected to chronic hypobaric hypoxia. Avian Dis 47:1291-1297.
84. Ogawa, Y., J. Kawabe, S. Onodera, K. Tobise, K. Morita, T. Harada, T. Hirayama, y A. Takeda. 1993. Role of endothelium in biphasic hypoxic response of the isolated pulmonary artery in the rat. Jpn Circ J 57:228-236.
85. Pak, O., A. Aldashev, D. Welsh, y A. Peacock. 2007. The effects of hypoxia on the cells of the pulmonary vasculature. Eur Respir J 30:364-372.
86. Pan, J. Q.; Tan, X.; Li, J. C.; Sun, W. D.; Wang, X. L. 2005. Effects of early feed restriction and cold temperature on lipid peroxidation, pulmonary vascular remodelling and ascites morbidity in broilers under normal and cold temperature. *British Poult. Sci* . 46 (3): 374–381.
87. Peñaloza M.D., Arias-Stella J. 2007. Circulation. 115:1132-1146.
88. Pfeilschifter J., Eberhardt W., Beck K.F. Regulation of gene expression by nitric oxide. 2001. Pflügers Arch - Eur J Physiol 442: 479–486
89. Pierce, K. L., R. T. Premont, y R. J. Lefkowitz. 2002. Seven-transmembrane receptors. Nat Rev Mol Cell Biol 3:639-650.
90. Pribnow D, Muldoon II, Fajado M, Theodor L, Chen LY, Magun BE. 1992. Endothelin induces transcription of fos/jun family genes: a prominent role of calcium ion. Mol En docrinol 6: 1003-1012.
91. Pulido, M. Ascitis aviar de orígen hipóxico: evaluación del daño cardíaco mediante la técnica electrocardiográfica y las posibles relaciones con los valores del índice cardíaco, hematocrito y hemoglobina. Tesis de M.Sc. Universidad Nacional. Bogotá, 1996.
92. Rengifo, L.J. 1979. Poliserositis en pollos barrilleros (Bolsa de agua). En: Congreso Latinoamericano de Avicultura, 6º. Anales. Ivita. P. 32 – 38.
93. Rodman, D. M. 1992. Chronic hypoxia selectively augments rat pulmonary artery Ca2+ and K+ channel-mediated relaxation. Am J Physiol 263:L88-94.

94. Semenza G.L. Regulation of mammalian O2 homeostasis by Hipoxia-Inducible Factor 1. 1999. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 1999. 15:551–78
95. Seo BG, Tschudl MR, Lûscher TF. 1994. Both ETA and ETB receptors mediate endothelin-induced contraction in human blood vessels. J. Hypertens. 12 (Suppl. 3): S127.
96. Sillau, A. H., y C. Montalvo. 1982. Pulmonary hypertension and the smooth muscle of the pulmonary arterioles in chickens at high altitude. Comparat Biochem Physiol A Comp Physiol 71:125-130.
97. Simonson MS, Herman WH. Protein kinase C and protein tyrosine kinase activity contribute to mitogenic signaling by endothelin-1: cross-talk between G protein-coupled receptors and pp60c-src. J Biol Chem 1993;268: 9347-57.
98. Solis de los Santos, F., G. Tellez, M. B. Farnell, J. M. Balog, and N. B. Anthony. 2005. Hypobaric hypoxia in ascites resistant and susceptible broiler genetic lines influences gut morphology. Poult. Sci. 84:145–148.
99. Stenmark K.R., & Mecham R.P. Cellular and Molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling. Annu Rev Physiol. 1997. vol. 59. p. 89-144.
100. Useche, J.; Hernández, A.; Herran, W. 1981. Morfometría cardiopulmonar en pollos de engorde ascíticos. *Rev. Col. Cien. Pec.* Colombia. 3(4): 213.
101. Vanhoutte, P. M. 1997. Endothelial dysfunction and atherosclerosis. Eur Heart J 18 Suppl E:E19-29.
102. Vásquez, I.C., Hernández, A. 2012. Hipertensión pulmonar en pollos, lapso de exposición a la hipoxia hipobárica y relación peso pulmonar: peso corporal, bajo condiciones de temperatura controlada. Rev. Colomb. Cienc. Pecu. 25: 81-89
103. Villaseñor, J.A.; Rivera Cruz, E. 1980. ¿Qué está pasando con la ascitis? En: Convención anual de ANECA, 5º. Resúmenes, México, p. 60.
104. Wideman RFJr., Maynard P., and Bottje W. Thromboxane mimics the pulmonary but not systemic vascular responses to bolus HCl injections in broiler chickens. Poult. Sci. 78:714–721, 1999.
105. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe S, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto k, Masaki T. 1988. A novel potent vasoconstrictorm peptide produced by vascular endotelial cell. Nature. Vol 332, 31 march. 411:415.
106. Zhang, H., Wu, C.X., Chamba, Y., Ling, Y. 2007. Blood Characteristics for High Altitude Adaptation in Tibetan Chickens. Poult Sci 86(7): 1384 - 1389.