

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

UNIDAD DE POSTGRADO

**Rol de óxido nítrico en la hipertrofia arteriolar
pulmonar y ventricular cardiaca derecha en pollos a
nivel del mar y expuestos a hipoxia de la altura**

TESIS

para optar el grado académico de Magíster en Fisiología

AUTORA

María Elith Vásquez Cachay

Lima-Perú

2009

*Una estrella bajo a mis manos,
Un rayito de sol iluminó mi caminar
Un susurro alegró mis oídos
Un angelito me dio la eternidad.*

*Con todo mi amor a Jose Antonio, quien
con una sonrisa
ha dado luz a mis días y esperanza a mi
corazón,
es la fuente de inspiración de mis
grandes proyectos.*

*A Jorge quien con amor y paciencia ha
sido el motor que me ha ayudado a
seguir un camino de éxitos y grandes
logros.*

*A mis padres que han estado conmigo
acompañándome y dándome su apoyo
incondicional para seguir con éxito
todas mis metas.*

*A Pelusa, Osito, Gordito, Lizi y
Shadow, quienes han sido mis
compañeros inseparables en todos estos
años y quienes han compartido mis
alegrías y tristezas.*

Agradecimientos:

Con mucho cariño un agradecimiento muy especial a quienes me han brindado amistad y cariño, y como hermanas han seguido mis pasos apoyándome en esos momentos duros que tiene la vida. Gracias Haydicita, Haydith y Dianita.

Al Dr. Sergio Cueva, Dr. Milder Ayón, Boris, José Luis, Juan y a Claudio que en todo momento han compartido conmigo mas que horas de trabajo y me brindan el calor de una familia

A la Dra. Hermelinda Rivera quien con sus consejos y sabias palabras me ha dado un soporte invaluable.

A la Dra. Mujica y al Dr. Aliaga, por su amistad y conocimientos que compartieron durante mis estudios y la culminación de mi tesis.

Al Dr. Raúl Rosadio, cuya amistad y apoyo incondicional han sido importantes para el desarrollo de esta Tesis.

Un agradecimiento muy especial a Miluska quien me ha apoyado en estos años y me ha demostrado la importancia de tener amigos de verdad.

A Nestor, un amigo que siempre esta dispuesto a ayudar y dar sus consejos, mil gracias.

Un agradecimiento especial:

A la Unidad del Centro de Diagnóstico de Sanidad Animal del SENASA en nombre del Dr. Acosta, Dr. Olivera y María; quienes brindaron un aporte invaluable en la ejecución de este proyecto.

A la Estación Experimental IVITA- El Mantaro, en nombre del Ing. Bojoquez, por darme las facilidades para el desarrollo de este estudio.

ÍNDICE

RESUMEN	viii
SUMMARY	ix
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. PATOGENIA DEL SÍNDROME ASCÍTICO Y DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL PULMONAR EN AVES.	4
2.2. RESPUESTA CELULAR A LA HIPOXIA	6
2.3. REMODELACIÓN VASCULAR	16
2.4. HIPERTROFIA CARDIACA	21
2.5. ÓXIDO NÍTRICO Y SU PARTICIPACIÓN EN EL SÍNDROME ASCÍTICO	23
2.5.1. Bioquímica del Óxido nítrico	23
2.5.2. Síntesis no enzimática del óxido nítrico	25
2.5.3. Vías de Señalización del Óxido Nítrico	26
2.5.4. Óxido nítrico y función cardiaca	28
2.5.4.1. Efectos del Óxido Nítrico sobre los Canales Iónicos Cardíacos	31
2.5.4.2. Efectos del Óxido Nítrico Sobre la Contractilidad Cardíaca	32
2.5.4.3. Efecto del Óxido Nítrico sobre la modulación de la contracción cardíaca	33
2.5.4.4. Estimulación β adrenérgica	34
2.5.4.5. Efecto sobre la relajación cardiaca	35
2.5.4.6. Efecto sobre la frecuencia cardiaca	36
2.5.5. Participación del Óxido Nítrico en la hipertensión Arterial	37
2.5.6. Rol del Óxido Nítrico en la Insuficiencia Cardíaca	38
2.5.7. Efectos del Óxido Nítrico sobre la Función Mitocondrial	40
2.5.8. Óxido nítrico y su participacion en cuadros de hipoxia	41
III. MATERIAL Y MÉTODOS	43

3.1.	LUGAR DE EJECUCIÓN	43
3.2.	ANIMALES	43
3.3.	MATERIALES	44
3.4.	MÉTODOS	48
3.4.1.	Distribución de animales	48
3.4.2.	Determinación de peso corporal	49
3.4.3.	Toma de muestras sanguíneas	50
3.4.4.	Determinación de hematocrito	50
3.4.5.	Determinación de los niveles de nitritos y nitratos	50
3.4.6.	Determinación del peso de las porciones cardíacas	51
3.4.7.	Determinación de la relación capa muscular/diámetro arteriolar (CM/DA) de arteriolas pulmonares	53
3.5.	MÉTODOS ESTADÍSTICOS	56
IV.	RESULTADOS	57
4.1	Peso corporal	57
4.2	Hematocrito	59
4.3	Nitritos y nitratos	60
4.4	Relación capa muscular / diámetro arteriolar (CM/DA)	61
4.5	Relación ventrículo derecho / ventrículo total (VD/VT)	63
4.6	Relación ventrículo derecho / peso corporal (VD/PC)	64
4.7	Correlación del tiempo de exposición y niveles de nitritos y nitratos sobre la presentación de hipertrofia arteriolar pulmonar e hipertrofia cardíaca.	66
V.	DISCUSIÓN	68
VI.	CONCLUSIONES	75
VII.	LITERATURA CITADA	76
VIII.	ANEXOS	103

RESUMEN

El síndrome ascítico es una de las principales causas de mortalidad en aves de producción de carne, siendo la hipoxia el factor desencadenante a la que se suma la respuesta del organismo mediante la liberación de diversas sustancias que conducen al cuadro patológico, tales como endotelina 1 (ET-1), óxido nítrico (ON), prostaglandinas y diversas citoquinas inflamatorias. Aún no se conoce el rol del óxido nítrico en la hipertrofia arteriolar pulmonar e hipertrofia cardiaca derecha que se observa en el síndrome ascítico. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar los valores de nitritos y nitratos, metabolitos estables del ON y su correlación con el grado de hipertrofia arteriolar pulmonar mediante la relación capa muscular/diámetro arteriolar (CM/DA) y con la hipertrofia cardiaca derecha mediante la relación ventrículo derecho/ventrículo total (VD/VT) y relación ventrículo derecho/peso corporal (VD/PC) en aves sometidas a hipoxia ambiental. De un mismo lote de aves machos de la línea Cobb vantes, nacidos a nivel del mar, se estudiaron 135 animales; 15 fueron sacrificados a 1 día de edad, en sus muestras se estudiaron diversas variables cuyos resultados fueron la base comparativa para los que se obtuvieron en los demás animales. Los 120 animales restantes fueron divididos en los grupos: nivel del mar (NM) 60 animales y altura (A) 60 animales. A los 10, 20, 30 y 40 días de edad se tomaron 15 aves (al azar) de cada grupo. Las variables determinadas fueron peso corporal (PC), hematocrito (Ht), nitritos y nitratos, CM/DA, VD/VT y VD/PC. Los resultados obtenidos muestran que el PC fue mayor a NM que en A ($p < 0.05$), mientras que el Ht fue mayor en A que a NM ($p < 0.05$), los niveles de nitritos y nitratos a NM fueron similares en todas las edades, mientras que en la A se observó una disminución a los 20 días ($p < 0.05$), un aumento a los 30 ($p < 0.05$) y a los 40 días una disminución a valores similares que a NM. Tanto a NM como en la A se observó un proceso de muscularización que llegó a su máximo desarrollo al día 40, sin ser diferentes entre dichos grupos. Las relaciones VD/VT y VD/PC mostraron una hipertrofia ventricular derecha en las aves sometidas a hipoxia cuya mayor magnitud ocurrió al día 30, siendo constante hasta el día 40, coincidiendo con la edad de mayor presentación de cuadros ascíticos. Al evaluar la correlación entre el tiempo de exposición a la hipoxia y los niveles de nitritos y nitratos como variables independientes con las variables dependientes CM/DA, VD/VT y VD/PC se encontró una fuerte correlación. Por tal motivo se concluye que las variaciones en la producción del ON afecta de forma directa la proliferación de la musculatura lisa de las arteriolas pulmonares y produce como mecanismo compensatorio una hipertrofia cardiaca derecha.

Palabras clave: Óxido nítrico, síndrome ascítico, hipertrofia cardiaca, hipertrofia arteriolar pulmonar, pollos.

SUMMARY

Ascitic syndrome is one of the main causes of mortality in broilers, being the hypoxia the leading factor to which is added the answer of the organism by liberation of diverse substances that conduce to the pathologic pattern, such as endothelin 1 (ET-1), nitric oxide (NO), prostaglandins and inflammatory chemokines. The role of NO in the pulmonary arteriolar hypertrophy and right cardiac hypertrophy observed in ascitic syndrome is still unknown. Hence, the aim of this study was to obtain the values of nitrites and nitrates, stable metabolites of NO, and its correlation with the degree of pulmonary arteriole hypertrophy through the muscular wall/arteriolar diameter (CM/DA) ratio, the right ventricular hypertrophy through the right ventricle/total ventricle (RV/TV) ratio and right ventricle/body weight (RV/BW) ratio in chickens raised at environmental hypoxia. A total of 135 male, Cobb vantes chickens and born at sea level were studied; 15 of them were sacrificed at 1 day age and diverse variables were determined in their samples whose results were used as comparative base line for those of the other animals. The remainder 120 chickens were distributed in the groups: Sea Level (SL) 60 birds and altitude (A) 60 birds. At 10, 20, 30 and 40 days old, 15 chickens were taken randomly to measure body weight (BW), hematocrite (Ht), nitrites and nitrates, MW/AD, RV/TV and RV/BW. The results showed that BW was greater at SL than at A ($p < 0.05$), whereas the Ht was greater at A than at SL ($p < 0.05$). The levels of nitrites and nitrates at SL were similar at all ages, whereas at A decreased at 20 days ($p < 0.05$), increased at 30 days ($p < 0.05$) and decreased to similar values observed at SL toward the 40 days. Both, at SL and at A a process of muscularization was found, whose maximum development was at 40 days old, without difference between these groups. RV/TV and RV/BW ratios showed right cardiac hypertrophy in chickens raised under hypoxia which became serious toward the 30 days being constant until 40 days old, agreeing with the age of greater presentation of ascites. The evaluation of the correlation between time of exposition to hypoxia and levels of nitrites and nitrates as independent variables with MW/AD, RV/TV and RV/BW ratios as dependent variables detected the correlation was strong. We conclude that variations in production of nitric oxide affect in a direct way the proliferation of smooth muscle of pulmonary arterioles conducting to a compensatory right cardiac hypertrophy.

Key words: Nitric oxide, ascitic syndrome, cardiac hypertrophy, pulmonary arteriolar hypertrophy, chickens.

LISTA DE CUADROS

- Cuadro N° 1: Distribución de las aves en grupos experimentales para la determinación de variables.
- Cuadro N° 2: Peso en gramos (g) de aves Cobb vantes (n=15 aves por grupo) criadas a nivel del mar y en altura (3 320 m.s.n.m.).
- Cuadro N° 3: Valores de hematocrito (%) de aves Cobb vantes (n=15 aves por grupo) criadas a nivel del mar y en altura (3 320 m.s.n.m.).
- Cuadro N° 4: Valores de nitritos y nitratos (μmol) en aves Cobb vantes (n=15 aves por grupo) criadas a nivel del mar y en altura (3 320 m.s.n.m.).
- Cuadro N° 5: Relación capa muscular / diámetro arteriolar (CM/DA) de arteriolas pulmonares de aves Cobb vantes (n=15 aves por grupo) criadas a nivel del mar y en altura (3 320 m.s.n.m.).
- Cuadro N° 6: Relación ventrículo derecho/ventrículo total (VD/VT) de aves Cobb vantes (n=15 aves por grupo) criadas a nivel del mar y en altura (3 320 m.s.n.m.).
- Cuadro N° 7: Relación ventrículo derecho/peso corporal de aves Cobb vantes (n=15 aves por grupo) criadas a nivel del mar y en altura (3 320 m.s.n.m.).
- Cuadro N° 8: Valores de correlación entre variables dependientes (CM/DA, VD/VT y VD/PC) y variables independientes (edad del ave y niveles de nitritos y nitratos).

LISTA DE FIGURAS

- Figura N° 1: Obtención del peso corporal de aves Cobb vantes.
- Figura N° 2: Toma de muestra de sangre: aves de 1 día de edad por punción cardiaca (a) y aves de 10 a 40 días a través de la vena alar (b).
- Figura N° 3: Apertura de la cavidad toracoabdominal del ave.
- Figura N° 4: División del corazón en ventrículo derecho, ventrículo izquierdo + septum.
- Figura N° 5: Pesaje de las diferentes porciones del corazón.
- Figura N° 6: Partes de arteriolas pulmonares.
- Figura N° 7: Medición de arteriolas pulmonares.

I. INTRODUCCIÓN

La exposición de los organismos a la hipoxia de altura produce activación de diferentes procesos moleculares que incluye la producción de sustancias vasoactivas tales como el óxido nítrico por parte del endotelio vascular, citoquinas inflamatorias como interlequina 1, factor de necrosis tumoral y otros factores inducidos por hipoxia. El óxido nítrico es un potente vasodilatador, cuyos niveles altos son asociados a una citotoxicidad celular no específica mediada por procesos inflamatorios relacionados con la producción del peroxinitrito, el cual fue identificado como uno de los oxidantes liberados por macrófagos como parte del mecanismo de protección. La generación de especies oxidantes es un proceso inevitable que ocurre como consecuencia de la adaptación de organismos a la vida aeróbica.

Algunos estudios muestran que la liberación del óxido nítrico se produce, en parte, por aumento del flujo sanguíneo pulmonar e incremento de la oxigenación y la ventilación. Estos hallazgos llevaron a postular la hipótesis de que una disminución en la capacidad de liberar óxido nítrico endógeno puede contribuir al desarrollo de la hipertrofia de la capa muscular lisa de las arteriolas pulmonares lo que conlleva a la presentación de hipertensión arterial pulmonar e hipertrofia cardíaca derecha causando una respectiva insuficiencia cardíaca y acumulación de líquido en cavidades y tejidos; este cuadro es conocido mal de altura o síndrome ascítico en aves y puede causar la muerte del animal, ocasionando grandes pérdidas económicas. No obstante el conocimiento obtenido en los últimos 20 años sobre este síndrome, sigue siendo un problema para la avicultura no sólo de América Latina sino a nivel mundial, cuyas pérdidas económicas anuales se calculan alrededor de un billón de dólares. Lo expuesto ha inducido a estudiar los factores que podrían influenciarse en la presentación del síndrome ascítico, particularmente el rol del óxido nítrico en la hipertrofia arteriolar pulmonar y ventricular cardíaca derecha en aves a nivel del mar y expuestas a la hipoxia de la altura.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La avicultura en el Perú es una de las industrias más desarrolladas, alcanzando el 57% del PBI pecuario y es la principal fuente de proteína para el poblador peruano, alcanzando cerca del 70% de la proteína total consumida en forma de carne y huevo. En el Perú la principal línea de producción de pollos parrilleros es Cobb vantes y abarca alrededor del 80% del total de la población de pollos en el Perú, debido a que demuestra ser la línea con mayor adaptación y rendimiento en el medio (MINAG, 2005), sin embargo la selección genética a la que se somete continuamente para obtener mayores rendimientos, la hace susceptible de presentar enfermedades cardiovasculares y metabólicas que asociadas a problemas sanitarios la hacen más susceptible de presentar enfermedades infecciosas; todo esto plantea la necesidad de evaluar constantemente las características fisiológicas de la línea, con el objetivo de determinar si las mejoras genéticas influyen negativamente sobre los parámetros fisiológicos.

El efecto de la selección genética en pollos de carne para lograr un elevado peso muscular en un marco óseo cada vez más pequeño que aloja los órganos internos, sumado al consumo de raciones altamente energéticas y proteicas para satisfacer la demanda de estas aves, genera un incremento en la mortalidad debido a enfermedades cardiovasculares y problemas musculoesqueléticos. En pollos de carne la presentación del síndrome de hipertensión arterial pulmonar causante del síndrome ascítico y muerte súbita es frecuente (Julian y Diaz, 1999), siendo considerado el síndrome ascítico como uno de los principales

problemas que enfrenta la avicultura moderna (Maxwell y Robertson, 2001). En el Perú, un estudio realizado en dos líneas de pollos parrilleros, demostró que el síndrome ascítico es el principal problema de mortalidad que enfrenta la avicultura (Francia, 2006).

En el Perú, las aves se distribuyen principalmente en la costa (alrededor del 70%), criadas bajo un sistema de producción intensivo y el resto se distribuye entre la selva y la sierra (MINAG, 2005), aunque esta última presenta el problema de hipoxia ambiental, que hace que las aves no se adapten y conforme aumenta la altura, disminuye la presión parcial de oxígeno ocasionando mayor presentación del síndrome ascítico.

La hipoxia ambiental y el frío predominante en las grandes alturas afectan a la mayoría de especies animales, siendo el bovino y el ave las más susceptibles (Peña *et al.*, 1992; Rodríguez, 1994). Estos factores ambientales sumados a los factores intrínsecos del ave desencadenan el cuadro de hipertensión arterial pulmonar y síndrome ascítico, la cual se caracteriza por un incremento de la resistencia al flujo sanguíneo en la circulación arteriolar pulmonar, que conduce a una hipertensión arterial pulmonar (Alexander *et al.*, 1960; Will *et al.*, 1962; Reeves *et al.*, 1963; Chauca y Bligh, 1976; Ayón y Cueva, 1998), dificultad del retorno venoso, hipertrofia del ventrículo derecho (VD) y en la mayoría de los casos insuficiencia cardíaca derecha que culmina con la muerte del ave (Lee *et al.*, 1994; Maxwell y Robertson, 2000).

Inicialmente el síndrome ascítico se presentaba en crías por encima de los 2000 m.s.n.m. (López-Coello *et al.*, 1982), sin embargo ahora se sabe que el síndrome ascítico al igual que otras alteraciones metabólicas del pollo de engorde, son el resultado de la presión de selección que ejercen los genetistas para obtener más carne en menos tiempo, originando un desequilibrio entre las necesidades de oxígeno para el crecimiento de los tejidos y la deficiencia del sistema respiratorio y cardiovascular para cubrir las demandas del organismo (López-Coello, 1997; Roush y Wideman, 2000) y se encuentra en pollos criados a nivel del mar debido a una hipoxia metabólica a la cual se suma un mal manejo de la ventilación e incremento de los niveles de amoníaco en el galpón (Wideman, 2000; Francia, 2006).

2.1 PATOGENIA DEL SÍNDROME ASCÍTICO Y DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL PULMONAR EN AVES.

El síndrome ascítico es conocido a través del mundo por diferentes nombres y fue reportado por primera vez en aves de producción de carne criadas en explotaciones sobre los 1300 m.s.n.m. (Lee *et al.*, 1994), pero éste se puede presentar en zonas de menor altitud bajo condiciones que generen deficiencia de oxígeno en el interior de los galpones debido a pobre ventilación que genere variaciones y/o deficiencia de oxígeno por presencia excesiva de gases como el dióxido de carbono y amoníaco, por otro lado tenemos el efecto nocivo de las micotoxinas (Hernández, 1986; Walker, 1993).

La hipertensión arterial pulmonar (HAP) es resultado del estrechamiento del lumen de las arterias pulmonares debido a vasoconstricción, hipertrofia e hiperplasia de células musculares lisas de la arteria pulmonar (Archer y Michelakis, 2002; Bradbury *et al.*, 2002). Las células musculares lisas vasculares y las células endoteliales juegan roles importantes en el desarrollo de la HAP (Veysier-Belot y Cacoub, 1999). Cuando la hipoxia es prolongada, la HAP no es solamente resultado del incremento del tono del músculo liso y de la policitemia, sino principalmente de la remodelación estructural de las arterias pulmonares distales (Roberts *et al.*, 1995; Weissmann *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2002).

El síndrome ascítico puede presentarse en aves de carne de cualquier edad; sin embargo su incidencia aumenta en forma abrupta a partir de la tercera semana de vida y continúa hasta el final del crecimiento y es mayor en machos (70%) que en hembras (Hernández, 1986); la relación con la edad se debe a que la curva de crecimiento del pollo de engorde es ascendente hasta la semana 6 (42 días), siendo mayor entre la tercera y quinta semana (Mack y Donald, 1998), observándose que cuanto mayor es la velocidad de crecimiento mayor es la presentación de HAP (Arce *et al.*, 1988).

La obtención de nuevas líneas de pollos de crecimiento rápido que implica un mayor metabolismo, incrementa la demanda de oxígeno por el organismo, la cual no es cubierta debido a que los sistemas cardiovascular y pulmonar son incapaces de realizar el intercambio de oxígeno y dióxido de carbono requerido (Moreno de Sandino y Hernández,

1996); este fenómeno nos lleva a concluir que el síndrome ascítico es consecuencia de un desbalance entre el acelerado crecimiento del tejido muscular esquelético que no puede ser sostenido por la lenta velocidad de maduración de los sistemas cardiovascular y respiratorio (Arce, 1991; Berger, 1992).

En las aves, el pequeño tamaño del corazón, el alto peso de la masa corporal, la presión que ejerce el contenido abdominal sobre los sacos aéreos y el pequeño tamaño pulmonar en relación al peso corporal están involucrados en el incremento de la incidencia del síndrome ascítico (Julian, 1993). La estructura del corazón del ave presenta una pared delgada en el ventrículo derecho y una válvula atrio ventricular derecha de tipo laminar muscular lo cual permite inducir falla cardíaca rápidamente; mientras que, los pulmones de las aves están firmes y fijados en la cavidad torácica, los cuales no se expanden con el ingreso del aire al pulmón. Por otro lado, los capilares sanguíneos y parabronquios pulmonares forman una estructura rígida que permite mínima expansión de los capilares sanguíneos cuando se requiere mayor aporte de sangre. El aire es movido a través de movimientos abdominales y pulmonares con movimientos dentro y fuera de los sacos aéreos; por lo tanto se considera a la anatomía y fisiología del sistema respiratorio como factores importantes en la susceptibilidad de pollos de carne a la HAP. También se sabe, que las aves sometidas a condiciones de hipoxia desarrollan una policitemia marcada (Cordova *et al.*, 1981) lo cual incrementa la viscosidad de la sangre y por consiguiente la resistencia al flujo, ocasionando una mayor carga de trabajo al corazón. Todo esto conlleva a un mayor gasto cardíaco lo cual está relacionado con un incremento de la frecuencia cardíaca sin aumentar el volumen sistólico (Ploog, 1982).

En suma el síndrome ascítico es resultado de la incapacidad del pollo de engorde para abastecer la alta demanda de oxígeno, necesaria para el mantenimiento de la elevada tasa de crecimiento (Odom y Chilian, 1993) siendo el desencadenamiento de tipo multifactorial teniéndose aspectos genéticos, nutricionales, tóxicos, sanitarios y ambientales (Scheele *et al.*, 1992).

2.2 RESPUESTA CELULAR A LA HIPOXIA

La baja presión de oxígeno (hipoxia ambiental) y la hipoxia metabólica que causa una hipoxia sistémica produce en todas las especies una respuesta que puede ser aguda o crónica, dependiendo del tiempo de exposición, lo cual cursa con cuadros de hipertensión arterial pulmonar (HAP), muscularización de arteriolas pulmonares, policitemia, hipertrofia ventricular derecha, hidropericardio y ascitis siendo muchos los mecanismos involucrados en cada uno de estos eventos.

El mecanismo primario de la vasoconstricción pulmonar por hipoxia (VPH) está circunscrito dentro del sistema vascular pulmonar, donde las principales estructuras anatómicas de respuesta son las arteriolas pulmonares distales o de resistencia (Sylvester, 2001). Esta vasoconstricción es consecuencia de la liberación de sustancias vasoactivas por el endotelio vascular tales como las prostaglandinas, tromboxanos, endotelina 1 (ET-1) y otros, jugando roles importantes las células musculares lisas vasculares y las células endoteliales (Veysseyer-Belot y Cacoub, 1999). Cuando la hipoxia es prolongada, la HAP no es solamente resultado del incremento del tono del músculo liso y de la policitemia, sino también de la remodelación estructural de las arteriolas pulmonares distales (Brij y Peacock, 1998; Weissmann *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2002).

Por otro lado la hipoxia incrementa la actividad simpática jugando un rol crítico en la regulación de la frecuencia cardiaca, volumen sistólico y frecuencia respiratoria (Mazzeo *et al.*, 1998). El incremento de la frecuencia cardiaca puede ser el primer paso necesario para la aclimatación y la consiguiente adaptación a la altura (Noel-Jorand y Burnet, 1994). La reducida tolerancia a la altura está asociada con una baja ventilación y una respuesta vascular incrementada (Hohenhaus *et al.*, 1995). La estimulación de la ventilación a través de activación de quimiorreceptores arteriales periféricos no es suficiente para reducir los niveles de eritropoyetina y la policitemia (Favier *et al.*, 1997).

La vasoconstricción producida por hipoxia se ha demostrado en todas las especies hasta ahora examinadas. En humanos hay incremento en la resistencia vascular pulmonar de aproximadamente 50% cuando la presión de oxígeno (PO_2) alveolar cae por debajo de 50 mmHg (Harris y Heath, 1986). La vasoconstricción hipóxica ocurre en pulmones aislados y perfundidos, en anillos de pequeñas arterias pulmonares, en aislados de células musculares vasculares lisas y en trasplantes de pulmones humanos siendo la evidencia más convincente que las conexiones del sistema neural no son necesarias para la respuesta (Dumas *et al.*, 1999), aunque la magnitud de la vasoconstricción hipóxica pulmonar es modulada por mediadores circulantes y del sistema nervioso autónomo (Archer y Michelakis, 2002).

En células musculares lisas de vasos pulmonares expuestas a hipoxia aguda se altera la actividad de los canales de potasio (K^+), cerrando uno o más tipos de canales de potasio que usualmente están abiertos bajo condiciones de normoxia (Dumas *et al.*, 1999); esta inhibición de canales de potasio puede provocar despolarización de la membrana y activar los canales de calcio dependientes de voltaje aumentando la concentración de calcio citoplasmático ($[Ca^{++}]_c$) lo que ocasiona contracción de las células musculares lisas pulmonares provocando vasoconstricción y se manifiesta como hipertensión pulmonar (Post *et al.*, 1995; Ward y Aaronson, 1999). La inhibición de los canales de K^+ por hipoxia se da principalmente en la familia de los canales de K^+ dependientes de voltaje (K_v) (Archer *et al.*, 2000) demostrándose que hay modulación de la actividad de los canales de K_v expuestos de las células musculares lisas de arterias pulmonares de ratas expuestas a hipoxia crónica (Reeve *et al.*, 1997), identificándose un canal específico el cual es de regulación baja. Dentro de estos canales tenemos los subtipos K_v 1.5 y K_v 1.2 (Wang *et al.*, 1997), mientras que Archer y col. (1998) demostraron la expresión de las subunidades K_v 1.5 y K_v 2.1.

El mecanismo por el cual la hipoxia altera la activación de los canales de K^+ es frecuentemente atribuída a la modulación redox (Weir y Archer, 1995). Se ha propuesto que la hipoxia y los inhibidores de la cadena de transporte electrónico mitocondrial actúan en sitios próximos a producción de especies reactivas de oxígeno (ROS); primero con un rápido cambio en el estado redox del pulmón hacia una reducción ocasionando un

aumento de los ROS seguido por una inhibición del flujo de K^+ independiente de ATP en las células musculares lisas vasculares, ocasionando vasoconstricción (Waypa *et al.*, 2001; Archer y Michelakis, 2002). Se demostró que los reductores ocasionan despolarización, inhibición de los canales de K_v y constricción en el tejido vascular pulmonar; mientras que los oxidantes tienen el efecto contrario (Reeve *et al.*, 1995). Otros autores afirman que la hipoxia ocasiona en la mitocondria disminución en la producción de los ROS (Dumas *et al.*, 1999).

En células musculares lisas de vasos sistémicos, cerebrales, mesentéricos y renales el flujo de K^+ no está inhibido en respuesta a la hipoxia, sugiriendo que los canales de K^+ sensibles a ATP (KATP) están abiertos, produciéndose una hiperpolarización de la membrana la cual inhibe la entrada de calcio, ocasionando una relajación de las células musculares lisas vasculares, lo cual se manifiesta como una vasodilatación sistémica (Patel *et al.*, 1997; Archer *et al.*, 1998; Brij y Peacock, 1998) similar a lo que ocurre en arteriolas pulmonares proximales o conductuales (Bennie *et al.*, 1991). Además, en arterias pulmonares proximales se observó inhibición de los canales de Calcio tipo L, mientras que el flujo mejora en canales de Calcio de las arterias pulmonares distales (Franco-Obregon y Lopez-Barneo, 1996a, 1996b; Archer *et al.*, 2000).

El mecanismo de contracción del músculo liso se da por incremento de la actividad de la enzima Fosfolipasa C vía proteínas G, la cual también se activa por acción de catecolaminas, angiotensina II y endotelina 1, las cuales catalizan al fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2) el cual es un lípido de la membrana celular para la formación de dos segundos mensajeros, el inositol 1,4,5- trifosfato (IP_3) y el diacilglicerol. El IP_3 se une a su receptor específico en el retículo sarcoplásmico que causa liberación de Calcio, como también ingreso del espacio extracelular a través de canales de Calcio en la membrana celular (dependientes de voltaje/ dependientes de receptor) (Bendall *et al.*, 2002).

La vasoconstricción hipóxica pulmonar es mantenida por este incremento del Ca^{++} intracelular en células musculares lisas de arteriolas musculares (Sylvester *et al.*; 2001; Ward *et al.*, 2004). Se ha demostrado también que hay entrada de calcio a través de canales abiertos por la propia reserva de calcio (Ng *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005; Weigand *et al.*,

2005) los cuales son activados y abiertos por la disminución en las reservas de calcio del retículo sarcoplásmico (Parekh y Penner, 1997; Parekh y Putney 2005). El diacilglicerol junto con el Calcio activan a la protein kinasa C (PkC), y el incremento del calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_c$) forma complejos con la calmodulina. Este incremento del $[Ca^{2+}]_c$ unido a calmodulina lleva a activación de la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCk) y se une a la actina ocasionando los puentes cruzados cíclicos e iniciando la contracción muscular (Kamm y Stull; 1985, Wang *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2003).

La contracción se mantiene por un mecanismo de sensibilización que inhibe la actividad de la enzima fosfatasa que actúa en la cadena ligera de la miosina (MLC fosfatasa) por acción de la enzima Rho kinasa. Esta sensibilización involucra a la Fosfolipasa C que mediante la acción del factor intercambiador de nucleótido guanina (Rho GEF) y la guanosina trifosfato (GTP) se une a la proteína RhoA incrementando la actividad de la Rho kinasa cuya función es la inhibición de la enzima MLC fosfatasa (Kamm y Stull 2001, Somlyo y Somlyo 2003; Sylvester, 2004). La relajación del músculo liso se da por disminución de la $[Ca^{2+}]_c$ debido a la salida del Calcio del citoplasma por la membrana del retículo sarcoplásmico (bomba Calcio Magnesio ATPasa) y por la membrana celular (intercambiador Na^+/Ca^{++}), además por el cierre de canales de Calcio dependientes de voltaje y receptores; esta disminución de $[Ca^{2+}]_c$ incrementa la actividad de MLC fosfatasa (Brij y Peacock, 1998; Sylvester, 2001; Webb, 2003).

El mecanismo por el cual la hipoxia altera la activación de los canales de calcio es frecuentemente atribuida a modulación redox (Weir y Archer, 1995). Se ha propuesto que la hipoxia y los inhibidores de la cadena de transporte electrónico mitocondrial actúan en sitios próximos a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS); primero con un rápido cambio en el estado redox del pulmón hacia una reducción, ocasionando una disminución de los ROS y seguido por inhibición del flujo de K^+ , independiente del ATP en células musculares lisas vasculares ocasionando vasoconstricción (Dumas *et al.*, 1999). Además los reductores ocasionan despolarización, inhibición de canales Kv y constricción en el tejido vascular pulmonar, mientras que los oxidantes tienen efecto contrario (Reeve *et al.*, 1995).

Otros autores afirman que la hipoxia ocasiona en la mitocondria aumento de la producción de ROS (Waypa *et al.*, 2001), los cuales pueden ser generados por los sistemas NAD(P)H oxidasa, xantino oxidasa, óxido nítrico sintetasa o la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Sham, 2002; Warnholtz *et al.*, 2002). Además del superóxido, la mitocondria también produce óxido nítrico (ON) y anhídrido carbónico (CO₂); por lo tanto, la estimulación de la producción del superóxido en condiciones hipóxicas puede llevar a la formación de especies reactivas de Nitrógeno (RNS) tales como el peroxinitrito (ONOO[·]) y la nitrosoperoxocarboxilato (ONOOCO₂⁻), que son productos de la reacción del ON con el superóxido y del ON con el CO₂ respectivamente, lo cual puede llevar a una mayor disfunción mitocondrial y endotelial a través de oxidación secundaria y nitración (Ballinger *et al.*, 2000).

Bajo condiciones hipóxicas, el superóxido se forma a partir de la ubisemiquinona del complejo III (Chandel *et al.*, 2000), que es un complejo que produce continuamente superóxido bajo condiciones normóxicas. La ubisemiquinona es un radical libre que se ha demostrado, transfiere un electrón al oxígeno molecular produciendo superóxido (Warnholtz *et al.*, 2002).

Se sugiere que la mitocondria podría ser el sensor de la vasoconstricción hipóxica pulmonar (VPH) a través de la disminución del estado energético. Se demostró que la inhibición del transporte de electrones causa vasoconstricción pulmonar durante la normoxia; sin embargo, el estado energético no disminuye durante la VPH en pulmones aislados o en la contracción hipóxica sostenida en cultivos de arterias pulmonares; por lo tanto, es más probable que los cambios en el estado energético influyan en la modulación de la VPH que en la activación de la respuesta (Sylvester, 2001).

En el endotelio actúan localmente sustancias vasoconstrictoras como son las prostaglandinas (PGs), tromboxanos y la endotelina 1 (ET-1). Muchas de las PGs son producidas en el endotelio y metabolizadas *in situ*. El metabolismo del ácido araquidónico en el pulmón se da principalmente por las enzimas ciclooxigenasas (COX) y lipooxigenasas las cuales son generadoras de una gran variedad de eicosanoides, dentro de los cuales tenemos a las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos que regulan el tono vascular (Dennis, 2000; Serhan y Oliw, 2001); siendo la COX la enzima que cataliza los

pasos comprometidos en el metabolismo del ácido araquidónico hasta la formación de las prostaglandinas, tales como la prostaglandina D2 (PGD2), prostaglandina E2 (PGE2), prostaglandina I2 o prostaciclina (PGI2), la prostaglandina F2 α (PGF2 α) y los tromboxanos, estos dos últimos con efectos vasoconstrictores (Adams, 1988; Meade *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1996). La liberación del ácido araquidónico a partir de los fosfolípidos de la membrana es mediada por la enzima fosfolipasa A₂ (PLA₂), siendo la PLA₂ citosólica la más relacionada a la VPH (Fujishima *et al.*, 1999; Ichinose *et al.*, 2002).

El efecto vasodilatador de las PGs se debe al aumento de la adenosina monofosfato cíclico (AMP_c) en el citosol, mientras que el efecto vasoconstrictor se debe a la disminución del AMP_c (Haroun *et al.*, 2004). La hipoxia de corta duración no induce a la COX-2 en células musculares lisas de arterias pulmonares (Bradbury *et al.*, 2002); mientras que otros autores afirman que la hipoxia aguda induce la expresión genética de la COX-2 en pulmones de ratas. La inducción de la COX-2 por hipoxia es modulada por el óxido nítrico, AMP_c y por los productos de la COX en especial la prostaciclina (PGI2) producida en el pulmón durante la hipoxia la cual induce la expresión de la COX-2 en el pulmón a través de un mecanismo de retroalimentación positiva (Chida y Voelkel, 1996).

En la capa media de las arterias pulmonares se observó la inducción hipóxica de la COX-2, la cual indujo un incremento de 4 a 5 veces en la liberación de PGE2, PGD2 y PGF2 α por células del músculo liso de la arteria pulmonar (Bradbury *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002).

El factor de necrosis tumoral α (TNF α), interleucina 1 (IL-1), IL-8 (Maloney *et al.*, 1998), IL-1 β , bradikinina (BK) y el factor de crecimiento transformante β_1 (TGF β_1) son citocinas que inducen expresión de la COX-2 (Bradbury *et al.*, 2002); además interfieren con la generación del AMP_c ocasionado por la PGI2 sugiriendo una regulación baja de la adenilciclase (Haroun *et al.*, 2004). La hipoxia en general lleva a liberación de citocinas inflamatorias desde las células endoteliales tales como IL-1, IL-6, IL-8 y TNF α y se sabe que la IL-6 está asociada al incremento de la permeabilidad de la célula endotelial (Warnholtz *et al.*, 2002; Pearlstein *et al.*, 2002).

La ET-1 es un péptido vasoconstrictor que incrementa la presión arterial, éste se forma a partir del procesamiento de la preproendotelina-1 a Big-ET-1 por una enzima convertasa de furina. La Big-ET-1 (38 aminoácidos) es transformada a ET-1 por la enzima convertidora de endotelina (ECE) que está asociado a la membrana, en las células endoteliales la ECE-1 está ubicada en sus membranas celulares (Pernow *et al.*, 1996; Sugden y Bogoyevitch, 1996). El efecto vascular de la ET-1 es mediada por 2 subtipos de receptores: la ET_A y la ET_B (Mizuguchi *et al.*, 1997). El receptor ET_A está localizado en células musculares lisas vasculares y produce vasoconstricción, mientras que el receptor ET_B, está localizado en la célula endotelial vascular, cuya activación resulta en vasodilatación por liberación de mediadores derivados del endotelio tales como el ON y la prostaciclina (Verhaar *et al.*, 1998). El receptor ET_B también está presente en células musculares lisas vasculares y media la vasoconstricción (Haynes *et al.*, 1995).

En la hipoxia se ha encontrado un incremento de los niveles plasmáticos de la ET-1 y del ARNm de la preproendotelina-1 (Earley *et al.*, 2002). La ET-1 es un potente mediador que contribuye al desarrollo de la hipertensión pulmonar crónica (Eddahibi *et al.*, 1995) además de sus propiedades mitogénicas (Hassoun *et al.*, 1992); sin embargo, es improbable que la ET-1 sea responsable de la VPH aguda, ya que el tiempo de la respuesta a la hipoxia es rápida y fácilmente reversible, mientras que la síntesis de ET-1 que no es preformada es relativamente lenta (Barnes, 1994; Celermajer, 1997).

Los miocitos de las arterias pulmonares requieren de la liberación basal de ET-1 para una activación previa, que puede incluir un incremento en la sensibilidad de los filamentos al Calcio y la parcial despolarización del potencial de membrana en reposo. Aunque el grado y los mediadores de la activación pueden variar con las especies. La constante inhibición de la VPH por antagonistas de los receptores de la ET-1 en animales intactos sugiere que la ET-1 juega un importante rol fisiológico (Sylvester *et al.*, 2001).

Debido a la exposición a hipoxia y altura, los mamíferos manifiestan un aumento en la producción de eritropoyetina (EPO) por las células intersticiales peritubulares renales, que tiene por función activar la masa de glóbulos rojos y la concentración de hemoglobina (Ebert y Bunn, 1999; Ge *et al.*, 2002).

La policitemia es un mecanismo compensatorio para mantener el reparto de oxígeno durante la permanencia en altura, pero cuando es excesiva se asocia con la enfermedad del mal de altura. Después de la exposición a la hipoxia, hay un aumento en el hematocrito, sin embargo hay considerables variaciones individuales, probablemente relacionados a la presión de oxígeno en el parénquima renal, al igual que otros factores con la regulación transcripcional de la EPO por la hipoxia en el tejido renal (Ou *et al.*, 1998; Ge *et al.*, 2002). Luego de la liberación de la EPO, la policitemia debería aumentar la oxigenación del tejido renal y reducir la síntesis de ésta; sin embargo los cambios en los niveles de la EPO, la oxigenación del tejido renal y el hematocrito no están bien correlacionados con el tiempo (Ou *et al.*, 1998; Fisher, 2003).

Con valores elevados de hematocrito se incrementa la viscosidad sanguínea, hasta tal punto que el flujo de sangre a los tejidos se compromete (Ebert y Bunn, 1999). Un severo incremento del número de glóbulos rojos, se asocia frecuentemente con la hipertensión arterial, resultando en complicaciones cardiovasculares severas. Sin embargo, algunos individuos tales como los que residen en las alturas, compensan bien el incremento de su hematocrito (Vogel *et al.*, 2003).

Estudios en macrófagos alveolares humanos, demuestran que el ON disminuye la producción de citocinas inflamatorias, incluyendo a la IL-1 β , TNF α y la proteína inflamatoria de macrófago 1. El mecanismo por el cual regula esta producción de citocinas es a través de la disminución del factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), que es un factor de transcripción sensible a potencial redox que controla su expresión. Un mecanismo por el cual bloquea la producción del NF- $\kappa\beta$ es a través de la proteína inhibidora I κ - β (Raychaudhuri *et al.*, 1999).

En todos los organismos aeróbicos, el oxígeno es esencial para la vida y el factor clave para la adaptación a la reducida disponibilidad de oxígeno es la transcripción del factor inducido por hipoxia 1 (HIF-1), compuesto de 2 subunidades, la subunidad redox-sensible HIF-1 α y la subunidad expresada constitutivamente HIF-1 β (Sandau *et al.*, 2001).

La subunidad HIF-1 α es degradado por la vía proteosomal durante la normoxia, pero es estabilizada bajo condiciones hipóxicas (Wenger, 2000; Sandau *et al.*, 2001; Agani *et*

al., 2002). La proteína Von Hippel Landau (pVHL) media la rápida ubiquitinación y la rápida degradación del HIF- α (incluyendo HIF-1 α y el HIF-2 α). La hidroxilación postranscripcional de un residuo de prolina en el dominio de la degradación dependiente de oxígeno del HIF- α se requiere para la interacción entre el HIF y pVHL (Yuan *et al.*, 2003). Se han identificado a las enzimas prolil y aspargil hidroxilasas como las que durante la normoxia median la rápida degradación de las proteínas HIF α (Ivan *et al.*, 2001; Jaakkola *et al.*, 2001; Lando *et al.*, 2003).

La regulación del HIF α es compleja e involucra múltiples mecanismos de control a nivel de degradación proteica y por lo tanto la estabilización proteica, traslocación nuclear y activación transcripcional (Bilton y Booker, 2003). Cuando estos mecanismos son estimulados por hipoxia se combinan sinérgicamente para inducir activación máxima del HIF y la regulación de la transcripción de al menos 40 genes incluyendo enzimas glicolíticas, transportadores de glucosa y factores de crecimiento endotelial (Semenza, 2001a).

La activación del HIF-1 es inducido no solamente por hipoxia sino también por citocinas inflamatorias tales como la IL-1 β y el TNF- α . En consecuencia, el HIF-1 puede jugar un rol importante no solamente en la homeostasis del oxígeno y la energía sino también en la respuesta inmune (Hellwig-Bürgel *et al.*, 1999). Otros factores mediados por receptores que estimulan comúnmente al HIF- α incluyen a la angiotensina II, la trombina (Gorlach *et al.*, 2001) y la señalización de intermediadores tales como el ON (Sandau *et al.*, 2000; Sheta *et al.*, 2001).

Las vías de la MAPk (mitógeno activador de proteína kinasa) y Akt (proteína quinasa B o serina/treonina kinasa) pueden cooperar para inducir la actividad del HIF α (Minet *et al.*, 2000; Zundel *et al.*, 2000). Hay cierta evidencia para sugerir que la cooperación de estas vías de kinasas con la hipoxia puede ocurrir a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en medios hipóxicos como un paso intermedio (Huang *et al.*, 1996; Semenza, 2001b); este mecanismo puede ser el medio por el cual, algunos factores estimuladores como la trombina, angiotensina y la IL-1 β influyen al HIF-1 α cuando son bloqueados por inhibidores de ROS y antioxidantes (Richard *et al.*, 2000; Gorlach *et al.*, 2001; Haddad, 2002). En esta vía las ROS, pueden entonces reclutar las vías MAPk o Akt

para activar vía HIF α la activación independiente de ligandos para varios receptores de factores de crecimiento tales como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Huang *et al.*, 1996). En hipoxia la transcripción de la ET-1 está regulada por el HIF-1 (Hu *et al.*, 1998; Yamashita *et al.*, 2001).

La transcripción del gen de la EPO es regulada por el HIF-1 (Tarumoto *et al.*, 2000; Wenger, 2002). Hay una secuencia dentro del gen de la EPO que le confiere sensibilidad a la hipoxia, esta área contiene una secuencia de 8 pares de bases (5' - TACGTGCT - 3') que permite unirse al HIF-1 (Brij y Peacock, 1998).

Por otro lado, el riñón tiene una gran capacidad reguladora de HIF, pero la expresión del HIF-1 α y HIF-2 α es selectiva con respecto al tipo de célula y zona de riñón; sin embargo, la expresión del HIF-2 α en las células peritubulares renales, sugiere un rol para la regulación de la EPO (Rosenberger *et al.*, 2002).

Las células endoteliales hipóxicas incrementan la inducción del gen de IL-8, el cual está ligado con sitios de activación del NF-Kappa β , sugiriendo que la hipoxia constituye un estímulo para la quimiotaxis leucocitaria y leucostasis tisular a partir de macrófagos alveolares (Karakurum *et al.*, 1994). Los ROS generados en todo este proceso actúan como elementos señaladores, regulando la secreción de citoquinas proinflamatorias que permiten la alteración de la permeabilidad endotelial (Ali *et al.*, 1999). Todas estas sustancias van a actuar incrementando la permeabilidad de la membrana de la célula muscular lisa al sodio induciendo su despolarización que produce una vasoconstricción que culmina con una hipertensión arterial pulmonar. El ON tiene como función regular este tono vascular, ejerciendo su acción en las células musculares lisas donde provoca un aumento del Guanosin Monofosfato Cíclico (GMPc) con la consiguiente vasodilatación. El ON al difundirse por la sangre puede ingresar al eritrocito y unirse a la oxihemoglobina y reaccionar con el fierro formando metahemoglobina e iones nitratos; además puede unirse al grupo hem de la desoxihemoglobina formando S-nitrosil hemoglobina y si se une a la cisteína de la posición 93 de la cadena β forma s-nitroso hemoglobina; estas últimas uniones no disminuyen la capacidad de transporte de oxígeno, siendo estas uniones de tiempo limitado (Schechter y Gldwin, 2003).

2.3. REMODELACIÓN VASCULAR

En el humano y diversas especies animales expuestas a la hipoxia crónica se ha observado que la vasoconstricción de las arteriolas pulmonares depende del incremento de la capa de músculo liso de éstas (Monge y León-Velarde, 1991; Hurtado, 1995), lo cual muestra un proceso de proliferación de células musculares lisas en la íntima, produciéndose muscularización (Peña *et al.*, 1992; Enkvetchakul *et al.*, 1995; Giesbrecht, 1995). Además, en pollos de producción de carne (Montalvo *et al.*, 1979) y en ratas (King *et al.*, 1995) se ha encontrado que las células maduras de músculo liso de las arteriolas pulmonares contienen abundantes organelas y miofilamentos.

Las células musculares lisas vasculares y las células endoteliales juegan roles importantes en el desarrollo de la HAP (Veysier-Belot y Cacoub, 1999). En situaciones con cambios vasculares aparece el fenómeno de remodelamiento vascular, que comprende los diferentes modos de cambios estructurales en la pared de los vasos que resulta en un aumento de la relación pared/luz. Estos cambios pueden no estar relacionados con un crecimiento neto sino con un proceso de reacomodamiento del material de la pared, especialmente de las células musculares lisas vasculares (CMLV) de la capa media. El remodelamiento vascular puede ser de distintos tipos, según los cambios cuantitativos del material de la pared, eutrófico, hipertrófico o hipotrófico y según disminuya (interno) o aumente (externo) el diámetro de la luz (Mulvany *et al.*, 1996). En la HAP, hay un cambio en la estructura de las arterias de resistencia que involucra la combinación de dos procesos, el remodelamiento eutrófico y el remodelamiento hipertrófico (Intengan y Schiffrin, 2000).

En el remodelamiento vascular eutrófico la pared vascular se reestructura de modo tal que las CMLV se alinean más cerca a la luz del vaso y disminuyen el diámetro de la misma, aunque no haya cambios en el volumen de la capa media. El mantenimiento del volumen de la capa media puede estar involucrando una combinación de procesos de proliferación hacia adentro, con reducción de la luz y un proceso de apoptosis en la periferia del vaso con disminución del diámetro externo. En cambio, en el remodelamiento vascular hipertrófico, hay proliferación o crecimiento de la media vascular, lo cual conduce

a una disminución de la luz y puede involucrar un aumento del tamaño de las células (hipertrofia) (Intengan y Schiffrin, 1999).

Durante el desarrollo de la hipertensión, hay una rápida activación celular que involucra cambios en la morfología celular y en su fenotipo llevando a una hipertrofia celular, aumento y deposición de proteínas de la matriz extracelular, particularmente de colágeno y elastina. Estos eventos llevan a un engrosamiento de la pared del vaso (Chien, *et al.* 1991; Hunter *et al.*, 1999) estando todas las células involucradas; de tal suerte que el estrés hemodinámico no sólo afecta la pared ventricular sino también la vascular. La hemodinámica intravascular es importante en los fenómenos de remodelación vascular, existiendo un incremento en la replicación de células del endotelio, del músculo liso y de su matriz extracelular. Los incrementos en la síntesis de colágeno y elastina ocurren durante el desarrollo de la hipertensión (Chien, 1999).

En hipoxia, el endotelio vascular actúa localmente produciendo mayor cantidad de sustancias vasoconstrictoras que vasodilatadoras como son las prostaglandinas (PGs), tromboxanos y ET-1, que además tienen actividades proliferativas (Dennis, 2000; Serhan y Oliw, 2001).

Son múltiples las sustancias de origen sistémico y/o local que en hipoxia pueden participar directamente en el proceso de vasoconstricción e hipertrofia de la pared vascular. Los elementos más críticamente involucrados en dicho proceso son las endotelinas (ET-1 y ET-3), las catecolaminas, la angiotensina II (Ang II), la histamina, metabolitos del ácido araquidónico y el factor transformador del crecimiento- β_1 (TGF β_1), los cuales son estimuladores del crecimiento celular; en contraposición a estos tenemos los factores con efectos antiproliferativos como son las kininas, prostaciclina y ON (Sylvester *et al.*, 1980; Voelkel y Tuder, 1997; Chrysant, 1998).

Para la producción de ET se requiere de un incremento de calcio intracelular; este incremento puede ser inducido por estímulos físicos o por la hipoxia, a través de receptores como los de trombina, AG II, vasopresina, arginina, TGF β_1 e IL-1 (Luscher y Wenzel,

1995). En hipoxia la transcripción de la ET-1 está regulada por el HIF-1 (Hu *et al.*, 1998; Yamashita *et al.*, 2001), mientras que el 17 β estradiol inhibe la expresión genética de la ET-1 en condiciones de hipoxia, debido a que interfiere con la actividad del HIF, probablemente a través de la competencia por cantidades limitadas del CBP/p300 (coactivador de transcripción que vincula un dominio fosforilado de AMP cíclico a la proteína de unión para facilitar el inicio de la transcripción) (Earley y Resta, 2002).

La acción mitogénica de la ET-1 se da cuando actúa a través de receptores acoplados a la proteína G (GPCRs), principalmente de la subfamilia Gq/11 quien va a activar a la fosfolipasa C (PLC) formando inositol tri-fosfato (IP-3) y diacilglicerol (DAG). El DAG activa las formas delta y epsilon de la proteína kinasa C (PKC), de allí se explica la estimulación de la MAPK y la precipitación de la cascada ERK (kinasa regulada por señalización extracelular) por la GPCRs (Clerk y Sugden, 1999).

En hipoxia crónica se activa el sistema renina angiotensina renal, con la consiguiente producción de Ang II, como consecuencia de la disminución del volumen minuto debido al menor pasaje de flujo del lado derecho del corazón al lado izquierdo y/o por estimulación simpática (Schlaich y Schmieder, 1998).

La Ang II produce hipertrofia del músculo liso vascular (MLV) mediada por radicales libres las que activan cascadas de señales que tienen efectos mitogénicos. Las vías que usan proteínas G involucran a la Gs (estimuladora de adenil ciclasa), la Gi (inhibitorio de adenil ciclasa) y Gq (estimuladora de PLC); ésta última estimula a la fosfolipasa C, activando a la PkC la cual actúa a través de una kinasa de la proteína serina/treonina, desencadenando a la llamada cascada de la proteína kinasa activador mitogénico (MAPK) (Bendall *et al.*, 2002).

Los receptores de Ang II acoplados a la proteína G (GPCR) son capaces de activar a la MAPK y en ciertas condiciones llevan a una respuesta mitogénica. La superfamilia MAPK incluye tres vías mayores, una vía que es la kinasa extracelular regulada por señal (ERK) 1/2 y 2 vías de PKs activadas por estrés que son la c-Jun NH2-terminal kinasa

(JNK) y p38 MAPK. Se sabe que existen 2 isoformas de la p38 (p38- α y p38- β) las cuales tienen funciones antagónicas, mientras la isoforma α induce hipertrofia, la β la inhibe (Wang *et al.*, 1998). La activación de las MAPK por factores de crecimiento, citoquinas y estrés celular median selectivamente una variedad de respuestas celulares que van desde el crecimiento y diferenciación celular hasta la apoptosis (Xia *et al.*, 1995; Hunter *et al.*, 1999; Esposito *et al.*, 2001).

Las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) producidas en hipoxia aumentan la actividad cardíaca y generan vasoconstricción al actuar sobre sus receptores α ; además de ejercer acción hipertrófica en su unión α -adrenérgica sobre la capa muscular lisa vascular (Xia *et al.*, 1995). La activación de las MAPKs por las catecolaminas inducirá al gen de respuesta de crecimiento temprano-1 (Egr-1) el cual inducirá hipertrofia por estimulación exclusivamente α -adrenérgica (Bendall *et al.*, 2002).

Estudios en células endoteliales de conejos, ovinos, humanos y ratas, han demostrado que la hipoxia induce el aumento de $[Ca^{++}]_c$ que acompañado de otros mecanismos como PkC (Weissmann *et al.*, 1999) y tirosina kinasa (Uzun *et al.*, 1998) activan al grupo de los mitógenos activos de la proteína kinasa (MAPK), las que pueden estar involucradas en la respuesta proliferativa y en la remodelación que ocurre en las 3 capas de la pared vascular en respuesta a la hipoxia (Brij y Peacock., 1998; Conrad *et al.*, 2000). El DAG junto con el calcio activan a la proteína kinasa C (PkC). Este incremento de la $[Ca^{++}]_c$ permite la unión del Ca^{++} a la calmodulina llevando a la activación de la kinasa de la cadena ligera de miosina (CLMK), produciendo la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (CLMP) (Kamm y Stull, 1985), que se une a la actina para producir los ciclos de puentes cruzados e iniciar la contracción muscular.

En hipoxia se incrementa la fosforilación de la CLM de las células musculares de arteriolas pulmonares (Murray *et al.*, 1990; Madden *et al.*, 1992) manteniendo la contracción por activación de la CLMK y por un mecanismo de sensibilización que inhibe la actividad de la enzima miosina fosfatasa que actúa desfosforilando a la MLCP, la inhibición se da por acción de la enzima Rho kinasa (Zhao *et al.*, 1996). Esta

sensibilización involucra a la fosfolipasa C que mediante la acción del factor intercambiador de nucleótido guanina (Rho GEF), la guanosina trifosfato (GTP), se une a la proteína Rho A incrementando la actividad de la Rho kinasa cuya función es la inhibición de la enzima miosina fosfatasa lo que permite el mantenimiento de la contracción (Kamm y Stull, 1985; Kamm y Stull, 2001).

La relajación del músculo liso se da por la disminución de la $[Ca^{++}]_c$ a través de la salida de calcio hacia el retículo sarcoplásmico por acción de la bomba calcio magnesio ATPasa, así como por la salida al extracelular a través de un intercambiador Na^+/Ca^{++} ; por otro lado hay cierre de canales de Ca^{++} dependientes de voltaje y canales dependientes de disminución calcio en el retículo sarcoplásmico. Esta disminución de la $[Ca^{++}]_c$ incrementa la actividad de la miosina fosfatasa (Brij y Peacock, 1998; Sylvester, 2001; Webb, 2003).

En la hipoxia prolongada, se produce remodelación vascular con remodelación de las 3 capas de la pared del vaso, siendo esta una de las respuestas al incremento de la presión arterial a través de receptores de estiramiento en la pared vascular. Los vasos sanguíneos son expuestos a varios mecanismos de estrés entre los que se incluye el estiramiento, estrés de la pared y el estrés por tensión (intercelular) (Yamazaki *et al.*, 1996, Voelkel y Tuder, 1997). El estrés por estiramiento estimula en las células del endotelio y del músculo liso la liberación de factores tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), serotonina (Azuma, 1999), ET-1, Ang II y TGF β los cuales producirán vasoconstricción y un aumento de la capa muscular lisa de las arteriolas (Ito *et al.*, 1993).

La activación de todos estos factores mitogénicos pueden producir una distorsión del espacio extracelular vascular y en ciertas circunstancias limitar la perfusión y la deformación del citoesqueleto (Bishop y Lindahl, 1999; Kim *et al.*, 2000). El estiramiento también lleva a la hidrólisis del difosfatidilinositol y a la formación de PkC por DAG activándose luego la fosfolipasa A y kinasas de tirosina. El mediador en el estiramiento sería la Ang II el que luego se acopla a la proteína Gq (Bendall *et al.*, 2002).

El estrés mecánico actúa sobre el mecanorreceptor de la CMLV y activa la fosfolipasa C (PLC) y por medio de ella a la PKC, que por medio de kinasas de serina/treonina actúa sobre la Raf-1 kinasa, MAPK kinasa, MAPK y la S6 kinasa. En el núcleo se forman c-fos y c-jun (*c-fos* y *c-jun* intervienen en la génesis de sarcómeros) de la PA-1 (activador proteico) que por medio del ribosoma 40S van a activar a la kinasa S6 y de allí la síntesis proteica (Esposito *et al.*, 2001; Bendall *et al.*, 2002).

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) juega un rol importante en la angiogénesis (Ferrara y Davis-Smyth, 1997); sin embargo, las células endoteliales no expresan VEGF bajo normoxia, sino en condiciones de hipoxia, donde los niveles de ARNm del VEGF se incrementan dramáticamente dentro de unas pocas horas de exposición (Liu *et al.*, 1995). En pulmones de ratas, la expresión del VEGF-A y de los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 se incrementan cuando éstos son sometidos a hipoxia crónica (Christou *et al.*, 1998).

También se conoce que la inducción de la COX-2 puede contribuir a la inhibición de la remodelación vascular pulmonar inducida por la hipoxia (Yang *et al.*, 2002). La producción de prostaglandinas (PG) actúan como un mecanismo de retroalimentación negativa, debido a que la PGE2 y PGI2 son potentes vasodilatadores e inhibidores de la remodelación vascular (Wen *et al.*, 1998; Bishop-Bailey *et al.*, 1999). Así mismo el ON también posee propiedades antimitogénicas sobre las células musculares lisas (Roberts *et al.*, 1995).

Especies como el bovino y el cerdo presentan una mayor vasoconstricción en hipoxia aguda y cuando son sometidos a hipoxia crónica presentan una mayor remodelación vascular pulmonar; sin embargo, hay excepciones para estos descubrimientos, el coati, otra especie con poderosa respuesta presora a la hipoxia aguda, no desarrolla remodelación vascular pulmonar cuando es expuesto a la altura por 6 semanas (Hanson *et al.*, 2000).

2.4. HIPERTROFIA CARDIACA

La hipertrofia cardiaca puede ser definida como el crecimiento exagerado del miocito en respuesta a un estímulo. En el corazón las sobrecargas de presión y volumen

ponen en marcha mecanismos de adaptación, dentro de los cuales es fundamental la hipertrofia; puede decirse entonces que ante una sobrecarga se produce una hipertrofia que pretende ser adaptativa.

La carga es la variable primaria responsable de la regulación de las propiedades del miocardio siendo el miocito el que responde estructural y funcionalmente a todo el espectro de cargas impuestas con cantidades diferentes de síntesis proteica, y las variaciones en más o en menos del nivel normal de cargas causan cambios rápidos aunque reversibles de esas respuestas. La alteración de la contractilidad es más evidente cuando la sobrecarga es de presión, y eso se debería a la influencia de determinadas estructuras intracelulares que aparecen o aumentan en respuesta a la carga, y de acuerdo a si es de presión o estiramiento. Al respecto Cooper (2000) hipotetiza que el componente microtubular del citoesqueleto responde con hipertrofia a la sobrecarga de presión.

Cuando la sobrecarga cardíaca es de volumen se produce dilatación (mayor radio) con mayor estiramiento del miocito y reclutamiento de otros en reserva. En la dilatación, el aumento del radio de la cavidad se equilibra con respecto a la tensión de la pared por incremento proporcional del espesor de la misma, y por la magnitud de la hipertrofia miocítica de lo cual va a depender el desarrollo de una hipertrofia ventricular (HV) adecuada o inadecuada. Pero si el espesor no aumenta el estrés de la pared si lo hace, facilitando una mayor dilatación agregada; llegando a una dilatación que genera más dilatación.

La forma excéntrica puede acompañarse de aumento del espesor de la pared, cuando hay sobrecarga de volumen y de presión, como puede pasar en la insuficiencia cardíaca (IC) en casos de cardiopatía hipertensiva (Opie, 1998). Aquí, intervienen estímulos y reacciones intermedias con participación de proto oncogenes y factores de crecimiento, segundos mensajeros y efectores que van a provocar modificaciones en el miocardio y en las proteínas contráctiles llegando a cambios estructurales expresivos de adaptación o que al final son el punto de partida para cuadros de desadaptación (Cody, 1995).

La respuesta hipertrófica se debe a la presencia de factores de crecimiento y de citoquinas actuando a través de distintas vías de señalamiento. Por la acción de Ang II, ET-1, catecolaminas y otras neurohormonas se activa a la PKC y se libera Ca^{++} desde los depósitos intracelulares, activándose al mismo tiempo la fosfatasa calcineurina y el Factor Nuclear de células T activadas (NFAT), con defosforilación y translocación de éste último; proceso que es esencial para la respuesta hipertrófica a los factores de crecimiento. El NFAT-3 es un miembro de la familia de factores de transcripción inicialmente descubiertos en la células T inmunes (Shimoyama *et al.*, 1999; Fiedler *et al.*, 2002).

El ON es un regulador negativo de la respuesta hipertrófica, por intermedio del GMPc, quien activa a la proteinkinasa tipo I (PKG I). Fiedler y col. (2002) han demostrado que el ON y el GMPc inhiben la vía calcineurin-NFAT y de esta forma la hipertrofia cardiomiocítica.

2.5. OXIDO NITRICO Y SU PARTICIPACION EN EL SINDROME ASCÍTICO

2.5.1 Bioquímica del Óxido nítrico

El ON es una molécula de corta vida media que es sintetizado en varios tejidos como el endotelio vascular donde es altamente difusible (Kobzik *et al.*, 1993), músculo liso, terminaciones nerviosas de la pared vascular cerebral y el tejido del sistema nervioso central. El ON se forma por acción de la óxido nítrico sintetasa (NOS) la cual convierte a la L-arginina en L-citrulina y ON. Este proceso requiere cofactores que incluyen oxígeno molecular, nicotinamida adenina dinucleotidofosfato (NADPH), flavin adenina dinucleótido (FAD), flavin mononucleótido (FMN), grupo Hem de la hemoglobina tetrahidrobiopterina (BH_4) y calmodulina (Stuehr y Griffith, 1992; Marletta, 1993; Andrew y Mayer, 1999; Babu *et al.*, 1999; Cosentino y Lücher, 1999).

Una vez producido el ON, éste es libremente difundido y puede ingresar a la célula del músculo liso de la arteria pulmonar para activar la guanilato ciclasa y producir guanosina 3'5' monofosfato cíclico (GMP_c). Al incrementar el GMP_c en las células del músculo liso de la arteria pulmonar se activa una kinasa sensible al GMP_c la cual fosforila

un canal de K^+ dependiente de calcio produciendo hiperpolarización, además se incrementa la $[Ca^{2+}]_c$ que conlleva a la vasodilatación (Hintze *et al.*, 1999; Hampl y Herget, 2000). El ON por lo tanto es considerado un potente vasodilatador, también favorece el desarrollo de procesos inflamatorios lo cual depende de estímulos tales como los vasodilatadores endógenos (histamina, bradicinina, trombina, ATP, acetilcolina, sustancia P), hipoxia aguda, onda pulsátil del flujo sanguíneo y de la presión intravascular, Ang II y ET-1 (Carville *et al.*, 1997). También participa en diversos mecanismos como activación de macrófagos y en procesos de neurotransmisión (NHBLI, 1994). El ON también es secretado por plaquetas, numerosas neuronas cerebrales y macrófagos alveolares (Perez *et al.*, 1997).

Se han identificado 3 tipos de NOS divididos en dos subgrupos: la constitutiva (constitutiva endotelial (eNOS) o tipo III y la constitutiva neuronal (nNOS) o tipo I) y la inducible (iNOS) o tipo II. Las sintetasas constitutivas son dependientes del complejo calcio-calmodulina, mientras que la sintetasa inducible se encuentra en macrófagos, es independiente del calcio y produce grandes cantidades de ON por periodos prolongados (Stuehr y Griffith, 1992; Kobzik *et al.*, 1993).

El ON es considerado una molécula reguladora endógena que está implicada en procesos proinflamatorios e inflamatorios en el pulmón, siendo las citoquinas inflamatorias como la interleucina 1β (IL- 1β), TNF α y MIP- 1α responsables de disminuir su producción vía eNOS (Raychaudhuri *et al.*, 1999).

En el tejido vascular existe una utilización continua de la L-arginina que se traduce en producción de ON, el cual tiene un rol fundamental en la regulación del tono arterial (Blackman *et al.*, 2000) y de la presión arterial pulmonar, mientras que en venas su efecto es menor. La producción de ON por el epitelio de las vías aéreas es dependiente del nivel de oxígeno inspirado (Ide *et al.*, 1999). Por otro lado se ha demostrado que el ON inhibe la agregación plaquetaria, disminuyendo la adhesión de estas a las fibras de colágeno y a otras proteínas adhesivas, asimismo el ON producido por los macrófagos actúa como un radical libre y es citotóxico para ciertos microorganismos y células tumorales (Perez *et al.*, 1997).

2.5.2. Síntesis no enzimática del óxido nítrico

El hallazgo de que los valores de ON aumentan durante la isquemia experimental incluso tras inhibir las NOS sugiere la presencia de otras vías de síntesis del NO. En un medio ácido (isquemia) los nitritos forman ácido nitroso (HNO₂) que puede reaccionar con nitritos o un donador de electrones para formar trióxido de dinitrógeno (N₂O₃) que, a su vez puede producir ON. De hecho, la infusión de nitritos aumenta el flujo sanguíneo en la arteria braquial antes y durante el ejercicio, incluso tras la inhibición de las NOS (Cosby *et al.*, 2003), lo que demuestra que los nitritos no sólo representan el principal producto de la oxidación del ON, sino también un importante depósito de ON. La xantinoxidasa (XO) del endotelio vascular también puede reducir los nitritos/nitratos a ON, particularmente en presencia de isquemia. Por último, los nitritos pueden reaccionar con la desoxihemoglobina para constituir una forma nitrosilada y S-nitrosohemoglobina generándose ON en esta reacción y la reacción del ON con thioles de la superficie celular está relacionado con efectos antimicrobianos y alteraciones en la función de la célula muscular lisa (Marletta *et al.*, 1990).

El efecto vasodilatador del ON es estimulado por diferentes factores entre los que se encuentran la hipoxia, el flujo sanguíneo, la tensión de estiramiento, la histamina, la noradrenalina, la bradiquinina, la trombina, ácidos grasos insaturados y la PGI₂ y es inhibido a su vez por las endotelinas (Alfonso *et al.*, 1997). También se han identificado además inhibidores de la síntesis de ON entre los cuales se destacan la hemoglobina, el azul de metileno y la N-monometil-L-arginina (L-NMMA) (Levesque *et al.*, 1994).

Es bien conocido que la vida media biológica *in vitro* del ON no sobrepasa los 6 segundos y es destruido por los aniones superóxidos, pero los radicales libres escindidores de la superóxido dismutasa prolongan su vida media. El ON aumenta la concentración de GMPc en las células musculares lisas a través de activación de la enzima guanilato ciclasa citoplasmática e inhibe la entrada de calcio y la liberación intracelular del mismo a las células musculares lisas, por lo cual se produce una disminución del calcio citosólico libre (antagonista del calcio endógeno) (Yamasigawa y Kurihara, 1988), además, el aumento del GMPc activa proteínas quinasas, las cuales a través de fosforilaciones de proteínas producen por ambas vías relajación muscular y vasodilatación.

El ON es liberado continuamente en condiciones basales, pero el endotelio incrementa su liberación en respuesta al estímulo de sustancias como acetilcolina, bradikinina, difosfato de adenosina, histamina, angiotensina II, 5 hidroxitriptamina y serotonina (Loscalzo, 1995; Harning y Drexler, 1997) pero es importante recordar que en condiciones fisiológicas el estímulo más importante para su liberación lo constituye el efecto de presión sobre las células endoteliales debido a un incremento en el flujo de sangre (Harning y Drexler, 1997).

2.5.3. Vías de Señalización del Óxido Nítrico

Dos son las principales vías de señalización del ON; la primera vía es la producción de guanosín-3', 5'-monofostato cíclico (GMPc) y la segunda es la S-nitrosilación de grupos tioles proteínicos, que están moduladas respectivamente, por la fosfodiesterasa 5 (PDE5) que se encuentra en las caveolas y la formaldehído deshidrogenada dependiente de glutatión.

El ON se une a la porción hemo de la guanilil ciclasa soluble (GCs), a la que activa y aumenta la producción de GMPc que, a su vez, activa a la proteincinasa G (PKG) y modula la actividad de diversas fosfodiesterasas (PDE) (Layland *et al.*, 2002; Massion *et al.*, 2003). A bajas concentraciones de ON (rango nM), el GMPc inhibe la PDE3, con el consiguiente aumento en los valores de AMPc, que activan la PKA y la corriente de entrada de Ca^{++} a través de los canales L de la membrana ($ICa^{++}L$) (Campbell *et al.*, 1996) proponiéndose luego que el aumento de AMPc podría también ser independiente de la vía GMPc e implicar la activación directa de las proteínas G (Miyamoto *et al.*, 1997); mientras que a mayores concentraciones de ON (rango $\mu\text{mol/l}$), la PKG inhibe la $ICa^{++}L$ y fosforila la troponina I disminuyendo la sensibilidad de los miofilamentos al Ca^{++} y la formación de enlaces cruzados durante la diástole (Kaye *et al.*, 1999); lo cual podría también inhibir los RyR2.

La S-nitrosilación está asociada con la capacidad del NO para reaccionar con grupos thiol del aminoácido cisteína presentes en diversas proteínas implicadas en el acoplamiento excitación-contracción (Stamler *et al.*, 2001). La S-nitrosilación de los

canales de Ca^{++} tipo L (Campbell *et al.*, 1996) y RyR2 (Xu *et al.*, 1999) modulan su actividad dependiendo del estado redox celular. En cardiomiocitos aislados, el S-nitrosoglutatión aumenta la amplitud de la ICa^{++}L (Campbell *et al.*, 1996) y puede incrementar (Xu *et al.*, 1998) o inhibir la probabilidad de apertura del canal RyR2 (Zahradnikova *et al.*, 1997) lo cual nos indica que el ON controla la actividad de los canales de Ca^{++} tipo-L y RyR2 a través de ambas vías de señalización, la PKG y la S-nitrosilación.

El eNOS está compuesto por dos proteínas globulares modulares que son el dominio reductasa y el dominio oxigenasa que están conectadas por una cadena proteica flexible. El dominio reductasa genera los electrones requeridos para la síntesis de ON debido a la utilización de NADPH, quien cataliza la deshidrogenación, los electrones son transferidos a la cadena proteica flexible hacia el dominio oxigenasa. Esta transferencia es activada por la unión de la calmodulina a la cadena proteica flexible que es dependiente de Calcio (Lüscher y Barton, 1997). El dominio oxigenasa consiste de un centro catalítico responsable de la producción de ON ya que ahí se unen los grupos proteicos Heme, L-arginina y el tetrahidrobiopterano (BH4). La localización de eNOS en las caveolas es necesario para la síntesis eficiente de ON y requiere myr cotranslocacional como también palm postranslocacional del eNOS. La caveolina 1 es la principal proteína que cubre a la caveola e interactúa con eNOS inhibiéndola. La interrupción de esta interacción inhibitoria es necesaria para la activación del eNOS (Drexler, 1998). La calmodulina es un activador alostérico esencial del eNOS ya que su unión a los sitios específicos del eNOS incrementa la frecuencia de transferencia de electrones del dominio reductasa al centro catalítico del eNOS. La activación del eNOS está regulada por la fosforilación del residuo serina 1177 la que requiere el reclutamiento de la AKT kinasa y la proteína de shock térmico 90 (Hsp 90) la cual funciona como un puente entre el eNOS y el AKT.

La unión del sustrato L-arginina al centro catalítico del eNOS puede ser inhibido por el antagonista competitivo endógeno ADMA (dimetil arginina asimétrica). El tetrahidrobiopterina (BH4) es un cofactor requerido para la síntesis de ON, cuya disminución puede resultar en un desacoplamiento del eNOS y la producción de O_2^- (anión superóxido) en vez de la producción de ON por la eNOS. Aún cuando el ON es

producido apropiadamente, éste puede ser rápidamente inactivado por el O_2^- particularmente bajo condiciones de estrés oxidativo (Behrendt y Ganz, 2002).

2.5.4. Óxido nítrico y función cardíaca

El ON puede ser producido prácticamente en todas las células del corazón, actúa como un regulador paracrino, autocrino e intracrino de la función cardíaca de forma directa sobre los cardiomiocitos y de forma indirecta como consecuencia de sus efectos vasculares (Massion *et al.*, 2003; Bolli, 2001).

En el miocardio, el NO regula procesos de acoplamiento excitación-contracción, frecuencia cardíaca, tono vegetativo, respiración mitocondrial (metabolismo energético), procesos de hipertrofia, apoptosis y la fase tardía del acondicionamiento isquémico. Por otro lado, el ON regula el tono vascular, la perfusión coronaria, la permeabilidad capilar y la agregación plaquetaria, además, desempeña un importante papel en el control de la angiogénesis, inflamación y la proliferación celular vascular. La regulación de todos estos procesos es sumamente compleja y depende no sólo de las concentraciones de ON, sino también del compartimiento celular donde se esté generando y de la vía de señalización activada, la situación fisiopatológica analizada, el estado redox celular y la presencia de otros mediadores celulares tales como acetilcolina, noradrenalina, bradicinina, angiotensina, etc. (Massion *et al.*, 2003; Bolli, 2001).

El ON en los cardiomiocitos es generado por las tres isoformas de la óxido nítrico sintetasa (Massion *et al.*, 2003; Schulz *et al.*, 2005) siendo la inducible la que produce más ON y a mayor velocidad (Nishida y Ortiz de Montellano, 1999). Para que el ON pueda ejercer sus múltiples acciones cardíacas, las distintas NOS se expresan en determinados microdominios celulares y sintetizan ON en la proximidad de su vía de señalización celular lo cual reduce el radio de difusión del ON en los cardiomiocitos, evita su inactivación por radicales libres y por la mioglobina aumentando su disponibilidad (Barouch *et al.*, 2002; Massion *et al.*, 2003; Schulz *et al.*, 2005).

La eNOS se expresa en el endotelio vascular y endocardio así como en los cardiomiocitos, los monocitos y las plaquetas (Hare, 2003; Schulz *et al.*, 2005); en los

cardiomiocitos se localiza en las caveolas del sarcolema y en particular en los túbulos T. Estudios han demostrado que en el humano predomina en el epicardio del ventrículo izquierdo (VI) y en la aurícula; mientras que en el hurón, su expresión es máxima en el epicardio del VI, aurícula derecha y en el nodo senoauricular; intermedia en la pared del ventrículo derecho y muy reducida en el endocardio del VI (Brahmajothi y Campbell, 1999). En el perro, la eNOS se expresa 15 veces más en los microvasos que en las grandes arterias coronarias; en éstas, la máxima expresión se observa en la arteria circunfleja, seguida de la arteria coronaria derecha, la descendente anterior izquierda y la aorta (Fulton *et al.*, 2000).

La eNOS presenta una doble acilación (miristoilación en Gly 2 y palmitoilación en Cys15 y Cys 26) que es necesaria para su anclaje en las caveolas, donde interactúa con las caveolinas-1 en células endoteliales y con las caveolinas-3 en cardiomiocitos, que la inactivan (Feron *et al.*, 1998). En las caveolas se colocaliza con diversos receptores (β -adrenérgicos, M2-muscarínicos, BK2-bradicinina), enzimas (proteincinasa C, Rho A, rac) y canales (HCN4) (Schulz *et al.*, 2005). Cuando un estímulo (p. ej., el aumento de la frecuencia cardíaca) o un agonista incrementan la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{++}]_i$) se forma un complejo Ca^{++} -calmodulina (Ca^{++} - $Ca^{++}M$) que desplaza a la eNOS de la caveolina-3 y la eNOS recupera su actividad catalítica (Feron *et al.*, 1998); sin embargo, estos agonistas producen una rápida desensibilización (minutos) de la eNOS y el aumento de las concentraciones del ON disminuye la $[Ca^{++}]_i$ a través de la inhibición de la entrada capacitativa de Ca^{++} (Dedkova y Blatter, 2002) ejerciendo un feedback negativo sobre su propia síntesis. La eNOS también puede activarse independientemente de la $[Ca^{++}]_i$, a través de la fosforilación por la proteína serina/treonina cinasa Akt. En las caveolas, la Hsp90 facilita la disociación de la eNOS de la caveolina-3 y su unión al complejo Ca^{++} - $Ca^{++}M$, y actúa como punto de unión entre la eNOS y la Akt, lo que facilita la fosforilación y la activación de la eNOS (Fulton *et al.*, 1999). Por el contrario, algunas proteínas (NOSIP-NOS3 interactin protein, NOSTRIN-NOS3 traffic inducer) interactúan con la eNOS y la translocan a estructuras del citosol donde se inactiva. Por otro lado, las estatinas facilitan la interacción entre Hsp90 y eNOS y aumentan la actividad de la eNOS, al disminuir los valores de caveolina-1 en las células endoteliales y en los cardiomiocitos (Feron *et al.*, 2001).

Las concentraciones de caveolinas modulan los efectos cardíacos de la eNOS, esto se comprueba con el hecho de que los ratones deficientes en caveolina-1 presentan una menor vasoconstricción en respuesta a la estimulación de los receptores α adrenérgicos debido a la mayor liberación de ON formado por la eNOS (Drab *et al.*, 2001), así como una miocardiopatía dilatada con hipertensión pulmonar (Zhao *et al.*, 2002). También los ratones deficientes de caveolina-3 presentan una miocardiopatía dilatada hipertrófica con activación de la vía de las proteincinasas reguladas por estímulos extracelulares ERK1/2 (Woodman *et al.*, 2002), acentuándose la miocardiopatía en los animales que carecen de ambas caveolinas (Park *et al.*, 2002). Las concentraciones de caveolina-3 disminuyen en perros con miocardiopatía hipertrófica, lo que aumenta la actividad no sólo de la eNOS, sino también de la nNOS (Sunada *et al.*, 2001); por el contrario, en la insuficiencia cardíaca (IC) pueden aumentar las concentraciones de caveolina-3, lo que contribuye a disminuir la actividad de la eNOS.

La principal regulación postranscripcional de la eNOS tiene lugar a través de la fosforilación de la Ser 1177, que aumenta su actividad, siendo éste el punto de acción de las proteincinasas B (Akt), A (PKA), C (PKC) y G (PKG) (Fulton *et al.*, 1999; Schulz *et al.*, 2005). La fosforilización de Ser 617 y Ser 635 producidas por PKA y PKB también activa la eNOS, mientras que la fosforilación de Thre 495 producida por PKC y PKA la inactiva (Michell *et al.*, 2002). La estimulación de las células endoteliales con histamina o sustancia P implica la desfosforilación de Thre 495; ello facilita la unión en este ámbito de la Ca^{++} M, la posterior fosforilación de la Ser 1177 y la activación de la eNOS (Fleming *et al.*, 2001).

En el corazón también tenemos la expresión de la nNOS en la aurícula, nodos senoauricular y auriculoventricular, arterias epicárdicas, terminales nerviosos simpáticos y vagales y las neuronas intracardíacas (Paton *et al.*, 2002; Sears *et al.*, 2004); también se ha identificado una variante de la nNOS en la mitocondria que es conocida como mtNOS o NOS α (Elfering *et al.*, 2002). En los cardiomiocitos, la nNOS se localiza en el retículo sarcoplásmico (RS), en la proximidad del receptor para rianodina (RyR2) y, por lo tanto, de los canales de Ca^{++} tipo-L, lo que sugiere que la nNOS podría regular los flujos de Ca^{++} en ambas estructuras (Xu *et al.*, 1999; Massion *et al.*, 2003). La nNOS contiene un dominio PDZ que le permite unirse a la caveolina-3 y a la ATP-asa Calcio-dependiente del

sarcolema o formar un complejo con la sinaptosina I y una proteína adaptadora (CAPON) en los terminales nerviosos cardíacos. La fosforilación de la Ser 847 de la nNOS por una proteínasa dependiente de Ca^{++} - Ca^{++} M inhibe la síntesis de ON.

En el caso de iNOS, este se encuentra ausente en corazones humanos normales; sin embargo, las citoquinas (IL-1 β , IL-6, TNF α , IFN γ) y el lipopolisacárido (LPS) inducen su expresión en el septo y el epicardio del ventrículo izquierdo, endotelio endocárdico y vascular, células inflamatorias (macrófagos), fibroblastos y células musculares lisas vasculares. En cardiomiocitos tratados con lipopolisacáridos o citoquinas, el aumento de las concentraciones de ARNm de iNOS y la disminución de la contractilidad cardíaca son máximos al cabo de 6h y en ocasiones su inducción no sólo disminuye la contractilidad, sino que puede inducir la necrosis y la apoptosis cardíaca. La actividad de la iNOS aumenta con el adenosín monofosfato cíclico (AMPC) o la activación de la PKC, lo que sugiere que el aumento en los valores de catecolaminas o de Ang II podría inducir la expresión de iNOS en el miocardio en casos de insuficiencia cardíaca (Kelly *et al.*, 1996).

2.5.4.1. Efectos del Óxido Nítrico Sobre los Canales Iónicos Cardíacos

En los miocitos ventriculares de ratón y cobayo el ON inhibe la corriente de entrada de sodio (INa), al reducir la probabilidad de apertura del canal y/o el número de canales funcionantes (Ahmed *et al.*, 2001); estos efectos pueden reproducirse con análogos permeables del AMPc y GMPc lo que indica que actúan a través de la activación simultánea de la PKG y PKA. El ON puede aumentar o inhibir la entrada de calcio (ICa^{++}) a través de canales tipo L, lo cual ha sido registrado en miocitos auriculares (Campbell *et al.*, 1996). El aumento de la ICa^{++} a través de estos canales es consecuencia de la activación inhibitoria de la PDE3 producida por el GMPc (Gauthier *et al.*, 2000), y esta inhibición es debida a un efecto mediado a través de la S-nitrosilación del canal o de la vía GMPc-PKG (Miyamoto *et al.*, 1997).

Los efectos del ON sobre los canales RyR2 del retículo sarcoplásmico también son contradictorios, y se ha propuesto que aumentan (Xu *et al.*, 1999) o reducen la probabilidad de apertura (Zahradnikova *et al.*, 1997). El ON aumenta las corrientes de K sensibles a acetilcolina [IK(ACh)] (Abi-Gerges *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2002) y ATP

(IKATP). La activación de los canales KATP del sarcolema o mitocondriales se produce a través de la vía GMPC-PKG y acorta la duración del potencial de acción, conserva las concentraciones de ATP y reduce la acumulación intracelular de Ca^{++} (Han *et al.*, 2002).

En miocitos ventriculares de cobayo, el nitroprusiato sódico aumenta la amplitud del componente lento de la corriente rectificadora tardía (IKs); este efecto implica la S-nitrosilación del canal Ks y se asocia con un acortamiento en la duración del potencial de acción (Bai *et al.*, 2004). Se ha demostrado que el ON bloquea los canales hKv1,5 que generan la corriente repolarizante auricular humana IKur, un efecto que implica la activación de la vía GMPC-PKG y la S-nitrosilación del canal (Núñez *et al.*, 2005).

2.5.4.2. Efectos del Óxido Nítrico Sobre la Contractilidad Cardíaca

Contractilidad basal

En corazones animales y humanos, el ON produce un efecto bifásico que puede reproducirse con donadores de ON (ON exógeno) y por el ON liberado desde las células endoteliales coronarias con bradicinina y sustancia P (Massion *et al.*, 2003). Este efecto implica un aumento de la ICa^{++} a través de canales tipo L secundario a la inhibición de la PDE3 producida por el GMPC, que activa la vía AMPc-PKA y fosforila el canal (Campbell *et al.*, 1996), aunque también podría participar la nNOS a través de la activación de los canales RyR2 (Xu *et al.*, 1999), y a la inhibición de la ICa^{++} L producida por la nNOS (Ashley *et al.*, 2002). En miocitos ventriculares de rata el aumento de nNOS aumenta la contracción basal (Ren *et al.*, 2004), mientras que los ratones que sobreexpresan 90 veces la eNOS cardíaca presentan una reducción de la contracción basal (Brunner *et al.*, 2001). Por otro lado, los inhibidores selectivos de la nNOS o en ratones nNOS^{-/-} aumentan la ICa^{++} L, el contenido de Ca^{++} , su liberación a través de los canales RyR2 del RS y por ende la contractilidad basal (Ashley *et al.*, 2002; Ren *et al.*, 2004). Sin embargo, en ratones nNOS^{-/-}, iNOS^{-/-} ó eNOS^{-/-} la contractilidad basal no se modifica (incluso aumenta en el caso de los iNOS^{-/-}) (Khan *et al.*, 2003). Ello es debido a que en estos modelos se encuentran presentes varios factores de confusión: la producción de ON por otras NOS no modificadas, un aumento en las concentraciones de péptidos natriuréticos auriculares que activan el GMPC y la hipertensión que desarrollan los ratones eNOS^{-/-}, que puede producir

adaptaciones estructurales típicas del fenotipo hipertrófico (rarefacción vascular, cambios en los depósitos intracelulares de Ca^{++}) (Massion y Balligand, 2003; Massion *et al.*, 2003).

2.5.4.3. Efecto del Óxido Nítrico sobre la modulación de la contracción cardíaca

Relación fuerza-frecuencia (RFF)

En estudios realizados en cardiomiocitos de ratas estimulados a frecuencias crecientes encontraron que aumenta la $[\text{Ca}^{++}]_i$ y la producción de ON lo que disminuye la amplitud de las contracciones y disminuye la relación fuerza-frecuencia; se sabe que estos efectos están mediados a través de la vía eNOS-PKG, que fosforila la troponina I y desensibiliza las proteínas contráctiles al Ca^{++} , ya que se reproducen con 8-bromo-GMPc (un activador de la PKG) y se bloquean con inhibidores de la NOS (Kaye *et al.*, 1999). La nNOS es necesaria para mantener la RFF, esto se descubrió con ratones nNOS^{-/-} quienes presentan una RFF plana, mientras que los ratones eNOS^{-/-} presentan una RFF similar a la de los ratones eNOS^{+/+} (Ashley *et al.*, 2002; Ren *et al.*, 2004). La RFF plana en los ratones nNOS^{-/-} es acompañada de una reducción en la corriente de Ca^{++} y en los depósitos de Ca^{++} del retículo sarcoplásmico a frecuencias rápidas. Ello podría deberse a que los depósitos de Ca^{++} del retículo sarcoplásmico no son capaces de rellenarse a frecuencias rápidas porque disminuye la recaptación de Ca^{++} y/o aumenta la liberación de Ca^{++} desde el mismo. Sin embargo, el hallazgo de que en estos ratones disminuye el cociente fosfolambano/ATP-asa calcio-dependiente del retículo sarcoplásmico o SERCA2 α (la actividad de la SERCA2 α aumenta y la del fosfolambano disminuye) hace suponer que la reducción de los depósitos de Ca^{++} sería debida a un aumento de su salida a través de los canales RyR2 a frecuencias rápidas (Khan *et al.*, 2003).

Distensión cardíaca

La distensión mecánica de los cardiomiocitos fosforila a la Ser 1179 de la eNOS a través de la Akt y aumenta la liberación del ON y por ende la contractilidad cardíaca. Este efecto inotrópico del ON desaparece en ratones eNOS^{-/-}, y es independiente del GMPc e implica una mayor liberación de Ca^{++} a través de los canales RyR2 del RS (Vila-Petroff *et al.*, 1999). Por lo tanto, el ON podría participar en el aumento de la contractilidad que se

produce para compensar el aumento del volumen telesistólico y la disminución del volumen por latido producidos al aumentar la postcarga del ventrículo izquierdo (efecto Anrep).

2.5.4.4. Estimulación β -adrenérgica

La nNOS y la eNOS se activan al incrementar la $[Ca^{++}]_i$, algo que sucede al aumentar la frecuencia cardíaca (Kaye *et al.*, 1999) o tras la administración de catecolaminas. La eNOS inhibe la respuesta inotrópica máxima producida por las catecolaminas en modelos animales y en el hombre (Massion *et al.*, 2003; Paulus y Brozwaer, 2004). La discrepancia entre la ausencia de potenciación β -adrenérgica observada en algunos ratones eNOS^{-/-} y la hallada en presencia de inhibidores no específicos de la NOS sugiere que la nNOS también podría atenuar el inotropismo β -adrenérgico.

Clásicamente se creía que la eNOS contrarrestaba el efecto inotrópico positivo de las catecolaminas por 3 mecanismos a) la inhibición de la ICa^{++}_L (Campbell *et al.*, 1996), ya sea a través de la una fosforilación dependiente de la PKG (Mery *et al.*, 1991) y/o b) por aumentar la actividad de la fosfodiesterasa 3 (PDE 3) sensible al GMPc que hidroliza el AMPc y disminuye sus concentraciones intracelulares (Han *et al.*, 1995), y/o c) el bloqueo de los canales RyR2 (Zahradnikova *et al.*, 1997). También se ha propuesto que la nNOS inhibe los RyR2 y la liberación de Ca^{++} desde el RS (Xu *et al.*, 1998) aunque en ocasiones, puede activar a los RyR2 (Barouch *et al.*, 2002).

Actualmente se cree que es la activación de los receptores β 3-adrenérgicos ($R\beta$ 3) la causante de la activación de la eNOS y de la producción de ON que inhibe el aumento de contractilidad producida por la estimulación simpática, debido a que a) la estimulación de los $R\beta$ -3 reproduce efectos inotrópicos negativos del ON en el corazón humano (Gauthier *et al.*, 2000), b) el ON no inhibe el aumento de la contractilidad producido por la estimulación β -adrenérgica en ratones que carecen de $R\beta$ -3 (Varghese *et al.*, 2000); c) el BRL37344, agonista de los $R\beta$ -3, produce un efecto inotrópico negativo que desaparece en ratones eNOS^{-/-} (no en los nNOS^{-/-}) (Barouch *et al.*, 2002) y d) los ratones eNOS^{-/-} o

deficientes en R β -3 muestran una potenciación de las respuestas inotrópicas y cronotrópicas positivas a las catecolaminas.

La estimulación de la vía R β -3-NO puede tener implicaciones en la insuficiencia cardíaca; en esta situación aumenta la expresión de los R β -3 (Moniotte *et al.*, 2001) lo cual, unido a la disminución de los R β -1, actuaría como un mecanismo protector frente a una excesiva estimulación simpática, que incrementa la [Ca⁺⁺]_i y el consumo miocárdico de O₂ (MVO₂).

2.5.4.5. Efecto Sobre la Relajación Cardíaca

La eNOS acelera la relajación, aumenta la longitud de los cardiomiocitos en diástole y desplaza la curva longitud pasiva-tensión hacia la derecha; además, antagoniza (no potencia) el efecto lusitrópico producido por las catecolaminas, observándose que los ratones eNOS^{-/-} muestran una mayor relajación en presencia de catecolaminas (Gyurko *et al.*, 2000; Layland *et al.*, 2002; Massion *et al.*, 2003). La mejoría de la relajación ha sido atribuida a la fosforilación de la troponina I producida por la PKG, que inhibe la formación de enlaces cruzados durante la diástole (Layland *et al.*, 2002). El aumento de la distensibilidad ventricular podría también deberse al ON liberado desde el endotelio. De hecho, la bradicinina y la sustancia P aumentan las concentraciones de GMPc en los cardiomiocitos y aceleran la relajación ventricular, efectos que se bloquean tras eliminar el endotelio endocárdico.

En cardiomiocitos aislados y en corazones aislados, las concentraciones de ON fluctúan durante el ciclo cardíaco, alcanzando concentraciones máximas (rango μ mol/l) al final de la diástole, justo lo contrario de lo que sucede con la [Ca⁺⁺]_i (Pinsky *et al.*, 1997). La liberación de ON disminuye cuando lo hace la precarga y aumenta marcadamente por la noradrenalina, lo que sugiere que el ON podría desempeñar un papel importante en el acoplamiento excitación-contracción. Así, cuando aumenta la precarga, la mayor liberación de ON mejoraría la distensibilidad ventricular y normalizaría la precarga. El análisis de las contracciones isométricas demuestra que el ON no modifica la velocidad de acortamiento cardíaco, pero reduce el pico tensional y acelera la relajación (Mohan *et al.*, 1996). Este

acortamiento de la contracción podría mejorar la perfusión coronaria, especialmente a frecuencias rápidas, que acortan la diástole y el tiempo de perfusión coronaria.

Todos estos resultados sugieren que el ON aumenta la reserva diastólica y participa en el mecanismo de Frank-Starling en respuesta al aumento de precarga a través del incremento de la distensión ventricular.

2.5.4.6. Efecto Sobre la Frecuencia Cardíaca

El ON tiene un efecto variado sobre la frecuencia cardíaca. En cardiomiocitos aislados presenta una disminución de la frecuencia cardíaca (Massion *et al.*, 2003; Paulus y Bronzwaer, 2004); sin embargo, el efecto directo del ON en las células del nodo senoauricular es variable, ya que activa la corriente marcapaso If sensible al GMPc (Musialek *et al.*, 1997) y/o inhibe el aumento de la ICa^{++L} producida por el isoproterenol en células del nodo senoauricular. En el nodo auriculoventricular, la eNOS produce una inhibición dependiente del GMPc de la ICa^{++L} mediada a través de la degradación del AMPc producido por la PDE2 tras la estimulación β adrenérgica (Han *et al.*, 1996).

La eNOS aumenta el tono vagal cardíaco y participa en el antagonismo producido por la acetilcolina (ACh) sobre la taquicardia causada por la estimulación β adrenérgica (Massion *et al.*, 2003; Paulus y Bronzwaer, 2004). Cuando la ACh estimula los receptores muscarínicos M2, éstos se translocan a las caveolas junto a la eNOS, que se activa y libera ON; éste activa la vía GMPC-PKG, que inhibe la ICa^{++L} en las células del nodo senoauricular y la frecuencia cardíaca (Gauthier *et al.*, 2000). De hecho, el efecto cronotrópico negativo de los agonistas muscarínicos y la inhibición de la ICa^{++L} producida por ACh en las células marcapaso desaparece en ratones eNOS^{-/-}, pero puede restaurarse tras la transfección del ADNc de la eNOS (Massion *et al.*, 2003).

El ON producido por la nNOS facilita la bradicardia inducida por vía vagal, tanto por aumentar la liberación en el ámbito presináptico de ACh como por inhibir la liberación de noradrenalina (NA). La nNOS actúa en la presinapsis (ganglios cardíacos y terminales vagales, donde su expresión alcanza los valores más altos y se colocaliza con la colina acetiltransferasa) y facilita la bradicardia inducida por vía vagal, tanto por aumentar la

liberación presináptica de ACh como por inhibir la liberación de NA (Sears *et al.*, 2004). El aumento de la liberación presináptica de Ach implica la activación de la vía GCs-GMPc, que inhibe la PDE3 y activa la vía AMPc-PKA; ésta a su vez, fosforila-activa los canales presinápticos de Ca⁺⁺ tipo N y P que controlan la liberación excitotónica de Ach. En ratones nNOS^{-/-} o tras el bloqueo de la nNOS disminuye la inhibición vagal de la frecuencia cardíaca y el aumento de la variabilidad de la frecuencia cardíaca, mientras que en aurículas de cobayo la nNOS potencia la liberación presináptica de ACh y la bradicardia vagal (Choate *et al.*, 2001). La nNOS también inhibe la liberación presináptica de NA; ello es consecuencia de la activación producida por el GMPc sobre la PDE2 en los terminales simpáticos, que inhibe la vía AMPc-PKA, la fosforilación de los canales de Ca⁺⁺ tipo N y la liberación de NA. Por el contrario, la inhibición de la nNOS aumenta la liberación de NA y la frecuencia cardíaca en respuesta a la estimulación nerviosa simpática (Paton *et al.*, 2002). Por lo tanto, la nNOS y la eNOS actúan en el ámbito presináptico y postsináptico respectivamente para modular el tono vagal cardíaco (Choate *et al.*, 2001).

2.5.5. Participación Del Oxido Nítrico En La Hipertension Arterial

Los últimos años hay evidencias indirectas acerca del defecto de la producción de ON como causa de alteraciones en la función vascular que caracteriza a muchas enfermedades vasculares incluyendo la hipertensión experimental en animales y en humanos (Calver *et al.*, 1992; Forte *et al.*, 1997) todo lo cual permite plantear que en algunos casos de hipertensión arterial, el problema radica en una insuficiente vasodilatación más que en una excesiva vasoconstricción.

Schilling y col. (1994) encontraron una disminución en la cantidad de ON endógeno del aire exhalado por pacientes hipertensos comparados con controles y Cockcroft y col. (1994) sugirieron que la producción basal de ON es anormal en la hipertensión arterial esencial. En 1997, Forte y col. realizaron estudios para estimar directamente la producción de ON en pacientes con hipertensión arterial esencial no tratada a través de la medición de la síntesis de nitrato inorgánico, que es el producto final de la oxidación del ON en seres humanos; al finalizar, los datos obtenidos sugirieron que la producción corporal total de ON en pacientes hipertensos está disminuida por debajo de la basal, una posibilidad a analizar como causa de la disminución en la síntesis fue la unión a

ella de inhibidores endógenos de la NOS tales como la metil arginina (Forte *et al.*, 1997) Una concentración suficiente de estos análogos de la arginina pueden unirse a la NOS y la L-arginina será limitada. Independientemente de la naturaleza exacta del defecto en la vía de la L-arginina-ON, esta anomalía puede ocupar un destacado lugar al abordar la fisiopatología de la hipertensión arterial.

La reducción en la síntesis de ON puede contribuir al incremento en la adhesión y agregación plaquetaria, en la quimiotaxis de monocitos y su adhesión endotelial, en las respuestas vasoconstrictoras, así como en la migración y proliferación de células del músculo liso vascular. Estos efectos relacionan estrechamente la hipertensión arterial con la aparición de hipertrofia vascular y enfermedad vascular oclusiva (Forte *et al.*, 1997).

En 1998, Cardillo y col. concluyeron que los pacientes hipertensos tenían insuficiente vasodilatación dependiente del endotelio en respuesta a la acetilcolina, pero preservaban la actividad del ON en respuesta a la estimulación β -adrenérgica, lo cual apoya la hipótesis de que en la hipertensión arterial existe una anomalía selectiva en la síntesis de ON, probablemente relacionada con un defecto en la vía del fosfatidilinositol. Hay evidencias de que el ON endógeno determina la sensibilidad a los efectos presores del ión sodio (Loscalzo, 1995).

Es conocido que el ON ejerce importantes efectos en muchos determinantes fisiológicos de la presión arterial incluyendo la regulación central simpática del flujo y la regulación renal del balance de sodio en respuesta a perturbaciones de la tensión arterial o del volumen de fluido extracelular (Calver *et al.*, 1992).

2.5.6. Rol del Óxido Nítrico en la Insuficiencia Cardíaca

En la insuficiencia cardíaca hay un desequilibrio ON/redox, ya que aumentan las vías enzimáticas que producen radicales libres (ejemplo NADPH oxidasas vasculares, xantino oxidasa (XO) cardíaca, enzimas mitocondriales, hemoglobina oxidada en los eritrocitos) que oxidan las proteínas que participan en el acoplamiento excitación-contracción e inactivan el ON y alteran la actividad y localización de las enzimas productoras de ON (NOS y XO) (Hare y Stamler, 2005); ello conduce a un

desacoplamiento mecanoenergético, caracterizado porque la reducción de la contracción no se acompaña de una reducción similar en el consumo de energía. Además, hay una marcada activación neurohumoral y un aumento de citocinas proinflamatorias que inducen la expresión de la iNOS (Prabhu *et al.*, 2000) y en ocasiones, aumentan la actividad de la nNOS y eNOS (Schulz *et al.*, 2005) y se modifica la localización de la iNOS (Damy *et al.*, 2003; Damy *et al.*, 2004).

Sin embargo, la hipótesis de que el ON desempeña un importante papel en la etiopatogenia de la insuficiencia cardíaca no concuerda con el hallazgo de que el ON ejerce un efecto cardioprotector frente a la isquemia o que en el miocardio insuficiente hay una menor expresión de NOS. De hecho, en modelos experimentales y en sujetos con insuficiencia cardíaca, la actividad de eNOS puede aumentar, disminuir o no modificarse (Hare, 2003; Massion *et al.*, 2003; Hare y Stamler, 2005), y la iNOS aumenta marcadamente en algunos estudios, pero no en todos (Hare, 2003; Massion *et al.*, 2003; Damy *et al.*, 2004; Ziolo *et al.*, 2004). Ello sugiere que los cambios en la expresión de iNOS y eNOS pueden ser un fenómeno que acompaña a la insuficiencia cardíaca, pero no su causa.

En el miocardio insuficiente, la disminución del ON podría contribuir a la menor vasodilatación coronaria endotelio dependiente, a la reducción de la relajación ventricular y al aumento del MVO₂ (Heymes *et al.*, 1999).

En la insuficiencia cardíaca se observa una reducción de la respuesta inotrópica a la estimulación β adrenérgica como consecuencia de alteraciones en la densidad receptora (disminuyen los R β 1 y β 2 y aumentan los R β 3 que median respuestas inotrópicas negativas) o en el acoplamiento del receptor con sus vías de señalización (aumenta la expresión de la cinasa específica del receptor β adrenérgico o ARK y de proteínas Gi, y disminuyen las Gs). Los R β 3 son más resistentes a la desensibilización homóloga que representa el aumento del tono simpático característico de la insuficiencia cardíaca, por lo que su estimulación facilitaría la producción continua de ON en presencia del incremento del tono simpático existente en la insuficiencia cardíaca (Moniotte *et al.*, 2001). Por lo tanto, el ON sintetizado a través de la vía R β 3-eNOS modularía la respuesta a las catecolaminas y antagonizaría su toxicidad en el miocardio insuficiente. De hecho, la

inhibición de la NOS potencia el aumento contráctil producido por los agonistas β adrenérgicos en modelos animales con insuficiencia cardiaca (Shinke *et al.*, 2000). Sin embargo, parece lógico pensar que el ON es tan sólo uno de los factores que regulan la respuesta a los agonistas β adrenérgicos en casos de insuficiencia cardiaca (Ungureanu-Longrois *et al.*, 1995).

En determinadas circunstancias, el aumento de ON sintetizado tras la inducción de la iNOS puede ser beneficioso en el miocardio insuficiente, ya que mejora la relajación ventricular (Damy *et al.*, 2004), reduce el MVO₂ (Chen *et al.*, 2002) y la respuesta a la estimulación β adenérgica y aumenta la angiogénesis (Jones *et al.*, 2004).

En la insuficiencia cardiaca aumentan las vías enzimáticas que producen radicales libres (NADPH oxidasas cardíacas se encuentran aumentadas, esto debido en parte al aumento de angiotensina II, XO vascular y la hemoglobina oxidasa eritrocitaria) lo que eleva a las enzimas productoras de ON (NOS y XO), produciendo vasoconstricción y desacoplamiento mecanoenergético. En modelos animales, la transición hacia la insuficiencia cardiaca implica un déficit en nNOS y eNOS y un déficit en la síntesis cardíaca de ON lo cual produce un aumento en la actividad de la XO (Hare y Stamler, 2005). El ON también regula una NADH oxidasa que inhibe la liberación de Ca^{++} por el retículo sarcoplásmico, por lo que el balance entre ON y estrés oxidativo también regula la función cardíaca a través de sus efectos sobre la señalización intracelular del Ca^{++} . La XO, un importante fuente de radical superóxido, aumenta en el miocardio y los vasos en casos de insuficiencia cardiaca (Landmesser *et al.*, 2002) produciendo disfunción endotelial, depresión de la función cardíaca, desacoplamiento mecánico-energético y apoptosis (Cappola *et al.*, 2001; Saavedra *et al.*, 2002).

2.5.7. Efectos Del Óxido Nítrico Sobre La Función Mitocondrial

Las NOS mitocondriales (nNOS, eNOS y mtNOS) son las causantes del 50% del ON citosólico en el miocardio de la rata y su actividad aumenta durante la hipoxia (Zaobornyj *et al.*, 2005). El propio ON a través de la vía GCs-GMPc regula la expresión de la mtNOS y la biogénesis mitocondrial, efectos que se asocian con un aumento de la fosforilación oxidativa y del contenido celular de ATP (Nisoli *et al.*, 2004). A

concentraciones nM el ON nitrosila e inhibe la citocromo c oxidasa (complejo IV) y como consecuencia a la respiración mitocondrial, a las enzimas implicadas en la glucólisis, el MVO₂ y el metabolismo energético (Trochu *et al.*, 2004). Además, regula los valores del factor de transcripción inducible por hipoxia y contribuye a la adaptación celular a la hipoxia.

El ON en altas concentraciones, en forma directa y a través de la formación de peroxinitrito inhibe los complejos I y II de la cadena respiratoria y las enzimas del ciclo de Krebs, produciendo una lesión cardíaca directa. Todo esto sugiere que el ON regula la contracción, el proceso de consumo de energía y la producción de energía por la mitocondria.

2.5.8. Óxido nítrico y su participación en cuadros de hipoxia

Se sabe que el ON juega un rol importante en el control de la proliferación muscular lisa asociada con la remodelación vascular (Carville *et al.*, 1997). La transferencia de genes de óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) inhibe la proliferación de células musculares lisas vía la regulación de p27 y p21, resultando en una disminución de la progresión del ciclo celular (Sato *et al.*, 2000). También el ON puede inhibir la expresión del gen de ET-1, la cual es responsable de la proliferación de las células musculares lisas, aumento del factor de crecimiento derivado de plaquetas (Sinha *et al.*, 1999) y el factor de crecimiento endotelial vascular (Azuma, 1999). En hipoxia, el iNOS es sobrerregulado en pulmones, lo cual produce cambios en la expresión del ON, que está correlacionado con el proceso de remodelación vascular (Li *et al.*, 1999). Estos cambios podrían estar llevando a un engrosamiento de la capa del músculo liso de la arteria pulmonar y a una consecuente hipertrofia cardíaca. Hay diferencias en los resultados de numerosos estudios bajo diversas especies animales y condiciones, lo que amerita ser dilucidado si ante un desafío hipóxico agudo hay un aumento o disminución de la liberación del ON (Dumas *et al.*, 1994; Fike *et al.*, 1998).

Actualmente la mayor cantidad de estudios está focalizado en la regulación del NOS. Así, la ausencia del eNOS ha sido asociada a una leve hipertensión pulmonar en ratones normóxicos, sugiriendo que el ON liberado podría participar en el bajo tono

vascular durante la circulación pulmonar en condiciones de normoxia (Stuedel *et al.*, 1997). En hipoxia crónica moderada la presión arterial pulmonar es muy elevada en ratones deficientes de eNOS (Stuedel *et al.*, 1998), sin embargo ante hipoxia severa el eNOS no es fisiológicamente efectivo (Fagan *et al.*, 1998) existiendo incremento de la expresión de iNOS. Durante la adaptación a la hipoxia el nivel plasmático de nitratos y nitritos se incrementan progresivamente y se correlacionan con el incremento de ON (Manukhina *et al.*, 2000).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN.

El presente estudio se llevó a cabo a nivel del mar en el Laboratorio de Fisiología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y en la Unidad del Centro de Diagnóstico de Sanidad Animal del Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA), en la ciudad de Lima (presión barométrica de 750 mmHg, presión parcial de oxígeno de 157 mmHg); y en la Estación Experimental del Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA), distrito de El Mantaro, provincia de Jauja, a una altitud de 3 320 m (presión barométrica de 510 mmHg, presión parcial de oxígeno de 107 mmHg).

3.2. ANIMALES.

Para el presente trabajo se criaron 200 aves de engorde machos, de la línea Cobb vantes, procedentes de un solo lote de reproductoras, nacidas a nivel del mar, de las cuales 135 fueron destinadas a ser evaluadas, las 65 restantes fueron mantenidas como reserva para garantizar que el número de animales de estudio a las diversas edades no disminuya

debido a la mortalidad que suele presentarse principalmente en el grupo de animales criados en altura. Las aves fueron criadas según los estándares establecidos para la crianza de aves de la línea, manteniendo condiciones similares a nivel del mar y en la altura. Las aves del grupo Nivel del Mar (NM) fueron estudiados a esa altitud, mientras que las del grupo de Altura (A) fueron trasladados a 3 320 m de altitud a los 2 días de edad.

3.3. MATERIALES

Crianza de Animales

- Alimento inicio para pollos broilers
- Alimento crecimiento-engorde para pollos broilers
- Bebederos tipo hongo
- Comederos tipo canal
- Campanas de calefacción
- Extractores de aire
- Biruta para cama
- Mallas
- Alambres
- Instalaciones eléctricas
- Jaulas para traslado de pollos

Reactivos

- Alcohol de 70°
- Alcohol de 80°
- Alcohol de 90°
- Alcohol de 95°
- Etanol
- Metanol
- Xilol
- Parafina
- Cloruro de Sodio 0.9%
- Solución de Zenker

- Ácido acético
- Tiosulfato de sodio
- Permanganato de potasio
- Ácido oxálico
- Lugol
- Permunt
- Agua destilada
- Alcohol yodado

Método de Griess Modificado

- Reactivo de Griess A: Ácido sulfanílico 1% en ácido fosfórico al 5%
- Reactivo de Griess B: N-1 Naftiletilendiamina al 0.1% en agua destilada
- Hidróxido de sodio (NaOH) 1,0 M
- Sulfato de Zinc (Zn SO₄) 30%
- Zinc en polvo

Colorante Hematoxilina Fosfotúngstica de Mallory

- Hematoxilina
- Ácido fosfotúngstico

Coloración Hematoxilina - Eosina

- Hematoxilina
- Eosina

Equipos

- Equipo de procesamiento de muestras
- Dispensador de parafina
- Balanzas analíticas
- Balanzas mecánicas
- Espectrofotómetro
- Centrífuga para tubos de ensayo
- Centrífuga para microhematocrito
- Estufa
- Horno para secado de material
- Microscopio binocular con luz incorporada

- Ocular para medición de tejidos en micras
- Cámara fotográfica digital

Material de Laboratorio

- Cassetes para muestras histopatológicas
- Jeringas de 1 ml
- Jeringas de 3 ml
- Jeringas de 5 ml
- Jeringas de 10 ml
- Jeringas de 20 ml
- Tubos de ensayo simple
- Tubos de ensayo graduados
- Tijeras de cirugía curvas
- Tijeras de cirugía rectas
- Pinzas diente de ratón
- Pinza simple
- Estilete
- Sonda acanalada
- Mango de Bisturí
- Hojas de bisturí
- Pinzas hemostáticas
- Hojas de afeitar
- Láminas porta objetos
- Láminas cubre objetos
- Cubetas de coloración
- Copas de coloración
- Pipetas de 1 ml
- Pipetas de 2 ml
- Pipetas de 5 ml
- Pipetas de 10 ml
- Pipetas volumétricas de 1 ml
- Pipetas volumétricas de 2 ml

- Micropipetas de 10 a 100 microlitros
- Capilares para microhematocrito
- Embudos
- Beakers
- Fiolas
- Matraz
- Picetas
- Gradillas
- Guantes quirúrgicos
- Desinfectante
- Fuentes de acero inoxidable
- Frascos de boca ancha
- Gasa
- Algodón
- Papel filtro 0.5 mm

Material de limpieza

- Guantes para lavado
- Esponjas para lavar
- Paños absorbentes
- Franela
- Jabón carbólico
- Detergente
- Kreso
- Escobillas para lavar tubos

Otros

- Cuadernos de registro
- Plumones indelebles
- Lapiceros
- Lápices de cera
- Fólderes

- Etiquetas adhesivas
- Bolsas plásticas de 5 cm x 10 cm
- Maskingtape de 1 pulgadas
- Maskingtape de 2 pulgadas
- Bolsas plásticas para basura
- Botas
- Mandiles

3.4. METODOS

3.4.1. Distribución de los animales

Del total de 200 animales, cuyas características fueron mencionadas, se tomaron al azar 15 aves de 1 día de edad para la determinación de diversas variables cuyos valores sirvieron de base comparativa del resto de aves (185) que fueron divididas en los dos siguientes grupos: Grupo nivel del mar (85) y Grupo Altura (100). De ambos grupos, a las edades de 10, 20, 30 y 40 días de edad, se tomaron al azar 15 aves; esto sumará un total de 135 aves de estudio (Cuadro N° 1). Las variables determinadas en los grupos experimentales fueron: Peso corporal (g), hematocrito (%), niveles plasmáticos de nitritos y nitratos (μmol), relación capa media/diámetro de arteriolas pulmonares (CM/DA), relación ventrículo derecho/ventrículo total (VD/VT) y relación ventrículo derecho/peso corporal (VD/P). Las aves tanto a nivel del mar como en altura fueron criados bajo las mismas condiciones de temperatura, tipo de alimento, tipo de cama, ventilación, siguiendo los estándares de crianza para la línea.

Cuadro N° 1: Distribución de las aves en grupos experimentales para la determinación de variables.

Grupo	Edad				
	1 día	10 días	20 días	30 días	40 días
Nivel del mar	15	15	15	15	15
Altura		15	15	15	15

3.4.2. Determinación del peso corporal.

Para la obtención del peso de las aves se usó una balanza analítica; este peso fue obtenido en forma directa (Figura N° 1) antes de la toma de muestras para la determinación de variables.



Figura N° 1: Obtención del peso corporal de aves Cobb vantres.

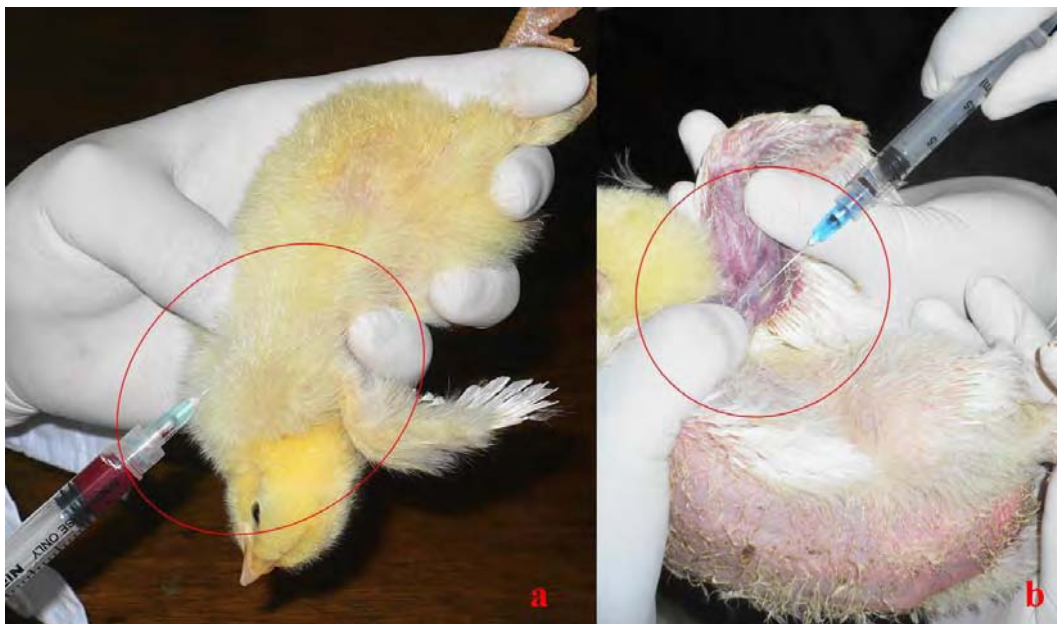


Figura N° 2: Toma de muestra de sangre: aves de 1 día de edad por punción cardiaca (a) y aves de 10 a 40 días a través de la vena alar (b).

3.4.3. Toma de muestras sanguíneas.

A las aves de 1 día de edad se les tomó la muestra de sangre por punción cardiaca (Figura N° 2a), obteniéndose 1.5 ml de sangre aproximadamente. A las aves de 10, 20, 30 y 40 días, tanto a nivel del mar como en altura, se les tomó aproximadamente 5.5 ml de sangre por punción alar (Figura N° 2b), el recojo de la muestra se hizo en un frasco conteniendo heparina sódica. Las muestras de sangre tomadas nos sirvieron para determinar el hematocrito y los niveles de nitritos y nitratos.

3.4.4. Determinación de hematocrito.

La determinación de hematocrito se hizo por medio de la técnica de microhematocrito, para lo cual después de homogenizar la sangre en los frascos, se procedió al llenado de las 2/3 partes del capilar para microhematocrito, el cual después fue sellado con calor por uno de los extremos y se procedió a centrifugar en una microcentrífuga a 12000 revoluciones por minuto, durante 5 minutos. Después del centrifugado, los capilares fueron leídos utilizando una regla de lectura directa para microhematocrito.

3.4.5. Determinación de los niveles de Nitritos y Nitratos

Método de Griess

Éste método se fundamenta en una reacción de diazotización. El reactivo de Griess usa sulfanilamida y dicloruro de N-1 nafiletilenediamina (NED) bajo condiciones ácidas (ácido fosfórico). Esta técnica detecta nitritos y nitratos, que son los dos principales productos estables del óxido nítrico (Green *et al.*, 1982; Gallardo, 1999; Miranda *et al.*, 2001).

Procedimiento

Los remantes de las muestras de sangre fueron colocados en tubos de ensayo, los cuales fueron centrifugados a 3000 revoluciones por minuto, durante 10 minutos para la obtención del plasma. El plasma fue desproteínizado utilizando ZnSO₄ en medio alcalino.

Los nitritos y nitratos fueron cuantificados utilizando el método de Griess. Las lecturas se hicieron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 520-550 nm, referidas a la absorbancia de soluciones de nitritos y nitratos de sodio.

3.4.6. Determinación del Peso de las Porciones Cardiacas

Luego de tomadas las muestras de sangre, las aves fueron sacrificadas por desarticulación occípito atloidea, procediéndose luego a abrir la cavidad abdominal y a levantar la porción pectoral, dejando expuesto el corazón (Figura N 4). Luego se procedió a extraer el corazón, separándolo del pericardio. Se removió la grasa pericárdica con ayuda de una tijera curva, así como las aurículas y las válvulas. Seguidamente se procedió a pesar el ventrículo total (VT) para luego dividir el corazón en ventrículo derecho (VD) y ventrículo izquierdo (VI) quedando el septum en la porción izquierda (Figura 5), luego se procedió al pesaje de cada ventrículo utilizando una balanza digital de precisión (Figura 6). Con los valores obtenidos se estableció la relación ventrículo derecho/ventrículo total (VD/VT), la cual es directamente proporcional a la magnitud de la hipertrofia ventricular derecha (Burton *et al.*, 1969). Además se determinó la relación ventrículo derecho/peso corporal (VD/PC) para establecer el desarrollo del ventrículo derecho con relación al desarrollo corporal.

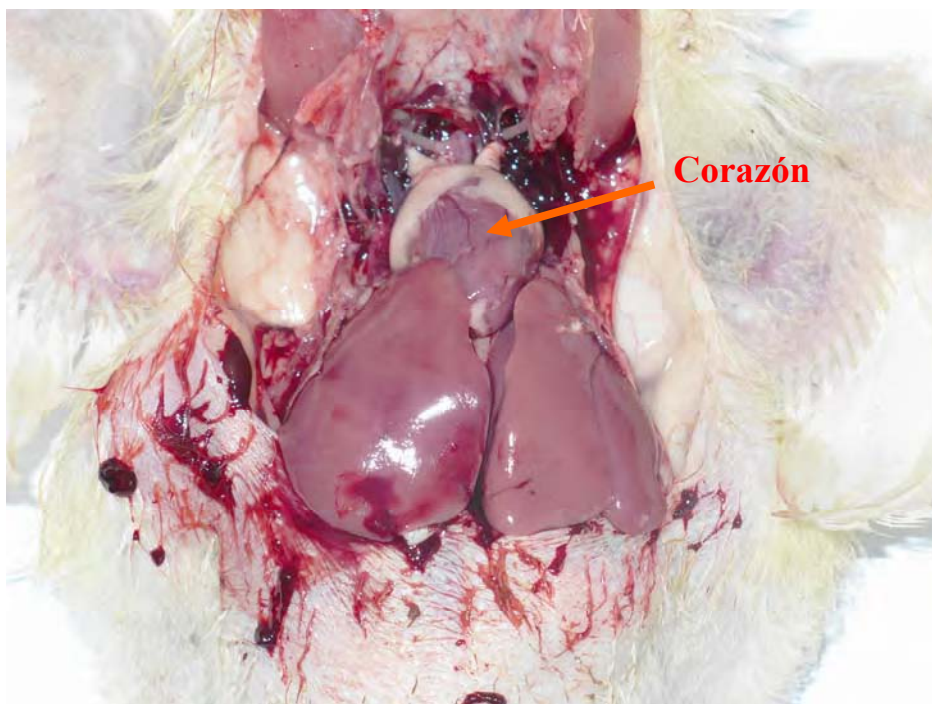


Figura N° 3: Apertura de la cavidad toracoabdominal del ave.



Figura N° 4: División del corazón en ventrículo derecho, ventrículo izquierdo + septum.



Figura N° 5: Pesaje de las diferentes porciones del corazón.

3.4.7. Determinación de la relación capa muscular/diámetro arteriolar (CM/DA) de arteriolas pulmonares.

Toma de muestras

Después de colectados los corazones, se procedió a remover los pulmones de las aves; de cada uno se procedió a tomar una muestra de aproximadamente 2 cm de alto x 2 cm de ancho x 2 cm de espesor; todas la muestras fueron colocadas en frascos conteniendo formol buferado al 10% a nivel del mar y al 15% en la altura, en una proporción de 1 de tejido y 10 de formol; que se transportaron al laboratorio para su posterior procesamiento.

Las muestras se dejaron en formol buferado por el lapso de 72 horas, luego se procedió a reducir las dándoles un tamaño aproximado de 0.5 cm x 0.5 cm x 0.5 cm, se colocaron en casetes para muestras histopatológicas y se lavaron con agua corriente por el lapso de 4 horas.

Procesamiento de muestras

Las muestras lavadas fueron colocadas en el equipo de procesamiento de muestras en el cual siguió el siguiente proceso:

Alcohol de 80°	1 hora
Alcohol de 90°	30 minutos
Alcohol de 95° I	30 minutos
Alcohol de 95° II	30 minutos
Alcohol de 100° I	30 minutos
Alcohol de 100° II	30 minutos
Alcohol de 100° III	30 minutos
Xilol I	1 hora
Xilol II	30 minutos
Xilol III	30 minutos
Parafina I	1 hora
Parafina II	30 minutos

Después de terminado este proceso las muestras fueron retiradas del equipo para su posterior inclusión. Las muestras fueron incluidas en parafina con ayuda de un dispensador de parafina. Los tacos formados se dejaron reposar por 24 horas, luego de lo cual se procedió a hacer los cortes con un espesor de 5 micras que fueron colocadas en láminas portaobjetos, quedando listas para su coloración.

Coloración de láminas

Las láminas preparadas fueron coloreadas con Hematoxilina fosfotúngstica de Mallory.

Proceso de Coloración de Hematoxilina Fosfotúngstica de Mallory (HPTA):

La coloración de HPTA tiene los siguientes pasos:

Desparafinado

- Xilol 1 5 minutos
- Xilol 2 5 minutos
- Alcohol 100° 1 5 minutos
- Alcohol 100° 2 5 minutos
- Alcohol 95° 5 minutos
- Alcohol 90° 3 minutos
- Alcohol 80° 3 minutos
- Alcohol 70° 3 minutos
- Agua destilada 1 5 minutos
- Agua destilada 2 5 minutos

Coloración

- Zenker 14 horas a 60° C
- Enfriar 1 hora
- Enjuague en agua corriente
- Lugol 15 minutos
- Tiosulfato de sodio 3 minutos
- Agua corriente 15 minutos
- Enjuague en agua destilada

- HPTA 2 horas a 60° C
- Enfriar 30 minutos

Deshidratado y Montaje

- Alcohol de 95° Enjuague
- Alcohol de 100° Enjuague
- Xilol 1 5 minutos
- Xilol 2 5 minutos
- Xilol 3 5 minutos
- Montaje con permount

Lectura de Láminas

Las láminas coloreadas con HPTA fueron leídas usando un ocular micrométrico y con un objetivo de 40x. Primeramente se procedió a revisar la lámina y seleccionar arteriolas que presentaban sus partes, íntima, subendotelio, capa media y adventicia (Figura 7), seleccionándose 10 arteriolas por ave, con diámetros externos comprendidos entre 35 a 220 micras. A cada arteriola se le midió el diámetro externo y el grosor de la capa muscular (Figura N° 8) y con los valores obtenidos se estableció la relación grosor capa muscular/diámetro arteriolar (CM/DA).

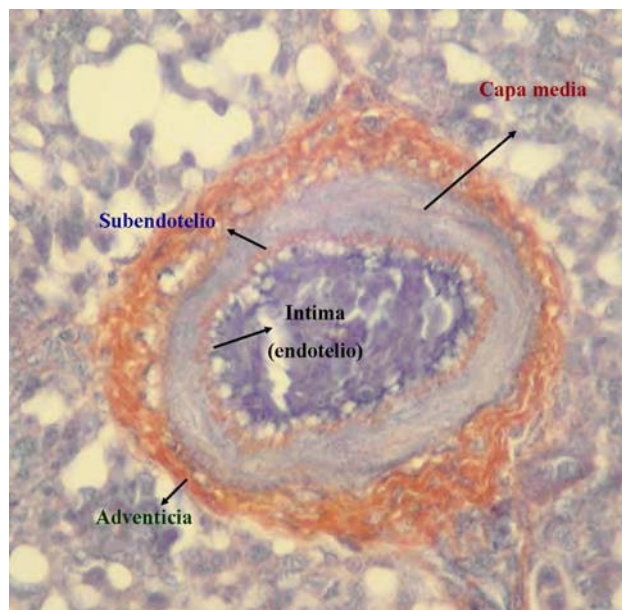


Figura 6: Partes de arteriolas pulmonares.

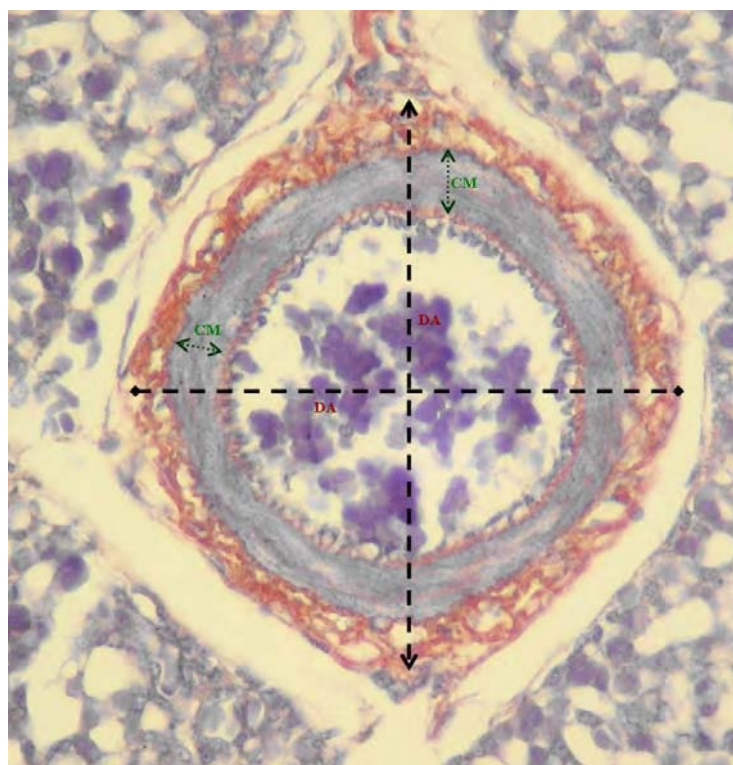


Fig N° 7: Medición de arteriolas pulmonares.

3.5. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Para el análisis estadístico se usó el software SPSS 15.00. Los resultados obtenidos fueron colocados en tablas para comparar los valores de los dos grupos (nivel del mar y altura), así como los de los grupos de la misma edad y de los grupos de edades diferentes, esto para ver el efecto del tiempo de exposición a la hipoxia.

Se utilizó la prueba de t-Student para comparar los valores de animales de nivel del mar con los de altura de la misma edad, con un poder de prueba de 80% y un nivel de significancia de 95%. Para comparar aves de diferentes edades se utilizó la prueba de Tuckey, lo cual nos permitió evaluar el efecto del tiempo de exposición. Con los resultados obtenidos se procedió a realizar la correlación de Pearson, utilizando como variables independientes la edad del ave, lo cual nos da el tiempo de exposición a hipoxia, y los niveles de nitritos y nitratos; las variables dependientes fueron CM/DA, VD/VT y VD/PC, las cuales nos ayudaron a relacionar la influencia de las variables independientes sobre la presentación de hipertrofia arteriolar pulmonar e hipertrofia cardiaca respectivamente.

IV. RESULTADOS

Los resultados encontrados en el presente trabajo de las variables de peso corporal, hematocrito (%), niveles de nitritos y nitratos (μM), relación capa media/diámetro arteriolar (CM/DA) de arteriolas pulmonares, relación ventrículo derecho/ventrículo total (VD/VT) y relación ventrículo derecho/peso corporal (VD/PC) en pollos de engorde de la línea Cobb vantes criados a nivel del mar y en altura (3320 m.s.n.m), se describen a continuación.

4.1. Peso Corporal

A nivel del mar el peso de las aves fue mayor ($p < 0.05$) que sus pares de altura, siendo la diferencia mucho más notoria a los 30 y 40 días en donde se obtuvo pesos de 1503 g (30 días) y 2620 g (40 días) a nivel del mar y de 934.33 g (30 días) y 1716.73 g (40 días) en la altura lo cual nos estaría indicando que por efecto de la hipoxia disminuye la tasa de crecimiento en comparación con aves normóxicas (Cuadro N° 2).

Cuadro N° 2: Peso en gramos (g) de aves Cobb vantres (n=15 aves por grupo) criadas a nivel del mar y en altura (3 320 m.s.n.m.).

Edad	Grupo	Nivel del Mar		Altura	
		Media	DS	Media	DS
1 día		56.22 ^a	2.91	56.22 ^a	2.91
10 días		186.27 ^a	20.73	111.67 ^b	9.42
20 días		689.73 ^a	71.08	406.00 ^b	32.30
30 días		1503.33 ^a	179.87	934.33 ^b	114.22
40 días		2620.00 ^a	238.38	1716.73 ^b	222.56

a,b: letras diferentes indican diferencia estadística significativa (p<0.05)

4.2. Hematocrito

Los valores de hematocrito de las aves a nivel del mar estuvieron comprendidos entre 23.80% a 1 día de edad, siendo este el valor más bajo y 29.47% que se obtuvo a los 10 días de edad fue el valor más alto ($p<0.05$); mientras que los valores entre los 10 y 40 días de edad fueron similares ($p>0.05$).

Los animales criados en altura presentaron un hematocrito en forma creciente, siendo a 1 día de edad el valor más bajo (23.80%), hacia los 10 días este aumentó de forma significativa ($p<0.05$) 34.07%, a los 20 día el hematocrito aumentó a 41.53% ($p<0.05$), y manteniendose constante ($p>0.05$) hacia los 30 días (39.78%) y 40 días de edad (42.73%).

Al comparar los resultados de nivel del mar con altura se observó diferencia significativa ($p<0.05$) a los 10, 20, 30 y 40 días de edad, siendo marcada la diferencia al día 40 de edad (Cuadro N° 3), lo cual nos indica que estas aves presentaron cuadros de policitemia.

Cuadro N° 3: Valores de hematocrito (%) de aves Cobb vantes ($n=15$ aves por grupo) criadas a nivel del mar y en altura (3 320 m.s.n.m.).

Edad \ Grupo	Nivel del Mar		Altura	
	Media	DS	Media	DS
1 día	23.80 ^{a1}	2.11	23.80 ^{a1}	2.11
10 días	29.47 ^{a2}	2.20	34.07 ^{b2}	4.62
20 días	29.13 ^{a2}	2.23	41.53 ^{b3}	4.36
30 días	28.67 ^{a2}	1.68	39.78 ^{b3}	4.43
40 días	28.13 ^{a2}	2.72	42.73 ^{b3}	4.98

a,b: letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($p<0.05$) entre las medias de diferentes alturas (columnas).

1,2,3: números diferentes indican diferencia estadística significativa ($p<0.05$) entre las medias de las diferentes edades (filas).

4.3. Nitritos y Nitratos

La determinación de nitritos y nitratos, considerados como los principales metabolitos del óxido nítrico, y considerados para este estudio como una medida indirecta de su producción, fue realizada mediante la técnica de Griess modificado obteniéndose los siguientes resultados. Al día de edad no se pudo cuantificar por este método el valor de nitritos y nitratos, por ello en el cuadro se considera 0.00, pero si estos valores fueron obtenidos a los 10, 20, 30 y 40 días de edad tanto a nivel del mar como en altura.

A nivel del mar los valores obtenidos fueron similares ($p > 0.05$) a los 10, 20, 30 y 40 días de edad, estando éstos comprendidos entre 0.7408 μM observado a los 10 días y 0.8808 μM observado a los 30 días. En altura los valores obtenidos fueron de 0.8033 a los 10 días que es diferente ($p < 0.05$) a su control de NM, para luego presentar hacia los 20 días una disminución marcada ($p < 0.05$) llegando a un valor de 0.5052, el cual también es menor ($p < 0.05$) a su control de NM. A los 30 días se observó un incremento significativo llegando al pico más alto, 1.2142, el cual es superior ($p < 0.05$) a su control de NM, para luego disminuir ($p < 0.05$) hacia el día 40, 0.7483, el cual es similar al valor observado a los 10 días en altura y su control de NM (Cuadro N° 4).

Cuadro N° 4: Valores de nitritos y nitratos (μmol) en aves Cobb vantes ($n=15$ aves por grupo) criadas a nivel del mar y en altura (3 320 m.s.n.m.).

Edad	Grupo	Nivel del Mar		Altura	
		Media	DS	Media	DS
1 día		0.00 ^{a1}	0.00	0.00 ^{a1}	0.00
10 días		0.7408 ^{a2}	0.1503	0.8033 ^{a3}	0.1834
20 días		0.8000 ^{a2}	0.2327	0.5052 ^{b2}	0.1839
30 días		0.8808 ^{a2}	0.1981	1.2142 ^{b4}	0.2730
40 días		0.7933 ^{a2}	0.0733	0.7483 ^{a3}	0.2412

a,b: letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre las medias de diferentes alturas (columnas).

1,2,3: números diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre las medias de las diferentes edades (filas).

4.4. Relación capa muscular / diámetro arteriolar (CM/DA)

La relación capa muscular/diámetro arteriolar (CM/DA) de las arteriolas pulmonares es la forma de medir el grado de muscularización de las arteriolas pulmonares. Los valores encontrados en aves sometidas a hipoxia fueron similares a los encontrados en sus controles de nivel del mar. Los valores de la relación encontrados a nivel del mar están comprendidos entre 0.1069 a los 10 días y 0.1478 a los 40 días de edad; mientras que en altura estos valores están entre 0.1069 a los 10 días y 0.1465 a los 40 días⁵.

Al comparar los resultados entre las diferentes edades de nivel del mar observamos que los valores de 1 día y de 10 días son similares ($p>0.05$), sin embargo el valor de 10 días es similar al de 20 días pero este último es diferente ($p<0.05$) al de 1 día. Los valores de 20 y 30 días son similares ($p>0.05$) pero son diferentes ($p<0.05$) a los valores anteriores.

En altura los valores de la relación CM/DA tuvo también una tendencia creciente, siendo el valor más bajo el observado a 1 día de edad (0.1069), el cual es similar ($p>0.05$) al de 10 días (0.1162); mientras que el de 10 días fue similar al de 20 días (0.1277) que a su vez es diferente ($p<0.05$) al de 1 día. El valor de 20 días es similar ($p>0.05$) al de 30 días (0.1370), pero a su vez éste es diferente ($p<0.05$) a los anteriores. Igualmente el de 30 días es similar ($p>0.05$) al de 40 días (0.1465), pero este es diferente ($p<0.05$) a las anteriores edades (Cuadro N° 5).

Cuadro N° 5: Relación capa muscular / diámetro arteriolar (CM/DA) de arteriolas pulmonares de aves Cobb van tres (n=15 aves por grupo) criadas a nivel del mar y en altura (3 320 m.s.n.m.).

Edad	Grupo	Nivel del Mar		Altura	
		Media	DS	Media	DS
1 día		0.1069 ^{a1}	0.0255	0.1069 ^{a1}	0.0255
10 días		0.1142 ^{a1,2}	0.0042	0.1162 ^{a1,2}	0.0043
20 días		0.1281 ^{a2}	0.0097	0.1277 ^{a2,3}	0.0084
30 días		0.1427 ^{a3}	0.0090	0.1370 ^{a3,4}	0.0064
40 días		0.1478 ^{a3}	0.0097	0.1465 ^{a4}	0.0119

a,b: letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre las medias de diferentes alturas (columnas).

1,2,3: números diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre las medias de las diferentes edades (filas).

4.5. Relación ventrículo derecho / ventrículo total (VD/VT)

La relación ventrículo derecho/ventrículo total (VD/VT) en aves Cobb vantes de nivel del mar fueron diferentes ($p < 0.05$) a los de altura a los 10, 20, 30 y 40 días siendo mayor la relación en altura que a nivel del mar. Estos valores nos estarían indicando que los animales sometidos a hipoxia ambiental presentan un cuadro de hipertrofia ventricular derecha.

En altura los valores estuvieron comprendidos entre 0.1173 (1 día) y 0.3613 (40 días), siendo similares ($p > 0.05$) los valores de 10 y 20 días entre sí, y los valores de 30 y 40 días entre sí. A nivel del mar también se observó una tendencia al aumento de la relación, y los valores estuvieron comprendidos entre 0.1173 (1 día) y 0.2409 (40 días), siendo similares ($p > 0.05$) los valores de 10 días con los de 20 y 30 días, así mismo el de 20 días es similar al de 30 y 40 días, pero el de 40 días es diferente al de 10 días.

Cuadro N° 6: Relación ventrículo derecho/ventrículo total (VD/VT) de aves Cobb vantes (n=15 aves por grupo) criadas a nivel del mar y en altura (3 320 m.s.n.m.).

Edad \ Grupo	Nivel del Mar		Altura	
	Media	DS	Media	DS
1 día	0.1173 ^{a1}	0.0426	0.1173 ^{a1}	0.0426
10 días	0.1922 ^{a2}	0.0272	0.2629 ^{b2}	0.0282
20 días	0.2191 ^{a2,3}	0.0541	0.3050 ^{b2}	0.0718
30 días	0.2022 ^{a2,3}	0.0235	0.3583 ^{b3}	0.0483
40 días	0.2409 ^{a3}	0.0492	0.3613 ^{b3}	0.0457

a,b: letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre las medias de diferentes alturas (columnas).

1,2,3: números diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre las medias de las diferentes edades (filas).

4.6. Relación ventrículo derecho / Peso corporal (VD/PC)

La relación ventrículo derecho/peso corporal (VD/PC), ayuda a observar el desarrollo del ventrículo derecho en comparación al desarrollo del ave, y por ende nos ayuda a dilucidar casos de hipertrofia ventricular. Los valores obtenidos en el presente trabajo fueron los siguientes:

A nivel del mar hubo un aumento ($p < 0.05$) en la relación en aves de 10 días en comparación con las aves de 1 día y este valor fue similar ($p > 0.05$) a las aves de 20 días, lo cual estaría relacionado a un incremento en el peso del ventrículo derecho en mayor proporción que la ganancia de peso a esas edades. Sin embargo la relación disminuye ($p < 0.05$) hacia el día 30 y se mantiene hacia el día 40, lo cual estaría relacionado a un aumento en el peso del animal en una mayor proporción que el aumento del peso del corazón. En altura se obtuvo un aumento bien marcado ($p < 0.05$) hacia el día 10 de edad, para luego disminuir sin ser significativo hacia el día 20 de edad, lo cual estaría relacionado a un aumento mayor en el peso del corazón que en la ganancia de peso. Sin embargo, esta relación se vuelve a incrementar ($p < 0.05$) hacia el día 30 de edad, para luego volver a valores similares ($p > 0.05$) a los de 10 y 20 días de edad.

Al comparar los resultados de altura con sus pares de nivel del mar observamos que los valores son mayores ($p < 0.05$) en los de altura (Cuadro N° 7)

Cuadro N° 7: Relación ventrículo derecho/peso corporal de aves Cobb vantres (n=15 aves por grupo) criadas a nivel del mar y en altura (3 320 m.s.n.m.).

Edad \ Grupo	Nivel del Mar		Altura	
	Media	DS	Media	DS
1 día	0.5007 ^{a1}	0.2187	0.5007 ^{a1}	0.2187
10 días	1.0569 ^{a2}	0.1732	1.6826 ^{b2,3}	0.2414
20 días	1.0383 ^{a2}	0.2663	1.4595 ^{b2}	0.2548
30 días	0.7309 ^{a3}	0.1252	1.7283 ^{b3}	0.2425
40 días	0.8625 ^{a2,3}	0.2244	1.6209 ^{b2,3}	0.2436

a,b: letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre las medias de diferentes alturas (columnas).

1,2,3: números diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre las medias de las diferentes edades (filas).

4.7. Correlación del tiempo de exposición y niveles de nitritos y nitratos sobre la presentación de hipertrofia arteriolar pulmonar e hipertrofia cardiaca.

Para evaluar la relación existente entre la exposición a la hipoxia, niveles de nitritos y nitratos sobre la presentación de hipertrofia arteriolar pulmonar e hipertrofia cardiaca se utilizó la correlación de Pearson utilizando como variables independientes la edad del ave, el cual nos indica el tiempo de exposición a la hipoxia por altura y los niveles de nitritos y nitratos; siendo considerados ambas variables como factores importantes para la presentación de hipertrofia cardiaca y arteriolar pulmonar. Como variables dependientes se usaron la relación capa media/diámetro arteriolar (CM/DA), ventrículo derecho/ventrículo total (VD/VT) y ventrículo derecho/peso corporal (VD/PC).

Los índices de correlación encontrados fueron: para la relación CM/DA un r de 0.73 en altura (R^2 : 0.53) y de 0.76 (R^2 : 0.58) a nivel del mar; lo cual nos estaría indicando que en altura el 53% y a nivel del mar el 58% del comportamiento de la variable dependiente es efecto directo del tiempo de exposición a la hipoxia así como de las variaciones que ha sufrido la producción de ON por efecto de la hipoxia.

El grado de correlación para VD/VT fue de 0.67 (R^2 : 0.45) a nivel del mar y el r para altura fue de 0.84 (R^2 : 0.71) así como el grado de correlación para VD/PC fue de 0.55 (R^2 : 0.30) a nivel del mar y 0.74 (R^2 : 0.51) para altura (Cuadro N° 8), lo cual nos indica que tanto la relación VD/VT como la relación VD/PC ha sido influida en un 71% y 51% respectivamente por efecto directo de la exposición a la hipoxia y de las variaciones de los niveles de ON y como consecuencia las aves han presentado cuadros de hipertrofia cardiaca en comparación con sus pares de nivel del mar.

Cuadro N° 8: Valores de correlación entre variables dependientes (CM/DA, VD/VT y VD/PC) y variables independientes (edad del ave y niveles de nitritos y nitratos).

Variable Dependiente \ Grupo	Nivel del Mar		Altura	
	r	R²	r	R²
CM/DA	0.76	0.58	0.73	0.53
VD/VT	0.67	0.45	0.84	0.71
VD/PC	0.55	0.30	0.74	0.51

V. DISCUSIÓN

Las líneas de pollos de producción de carne son sometidas a mejoras conducentes a lograr gran ganancia de peso en periodos cortos de tiempo; pero esta ganancia supera al desarrollo de los sistemas cardiovascular y pulmonar, predisponiendo a las aves a presentar diversos cuadros respiratorios y metabólicos de índole patológico. Debido a este problema el Ministerio de Agricultura recomienda hacer evaluaciones permanentes de los parámetros fisiológicos en las aves productoras de carne debido a que estas sufren mejoras constantemente. A nivel mundial la industria avícola pierde millones de dólares por la presentación del síndrome ascítico y muerte súbita, lo cual actualmente se presenta no solo en crianzas que sobrepasan los 1000 m. de altitud, sino también se puede observar en crianzas a nivel del mar, cuando por motivos de manejo se altera la ventilación del galpón lo cual sumado a la alta demanda de las aves genera una hipoxia metabólica. Francia en el 2006, reporta que la principal causa de mortalidad de aves en granjas en Lima es por síndrome ascítico seguido de muerte súbita, lo cual ocurre entre la quinta y sexta semana de edad.

En el presente estudio se buscó correlacionar los niveles de nitritos y nitratos, productos finales del metabolismo del óxido nítrico y sus variaciones producto de la exposición a la hipoxia, con la presentación de cuadros de hipertrofia arteriolar pulmonar e

hipertrofia cardiaca; para lo cual se evaluaron diferentes variables como peso corporal, niveles de nitritos y nitratos, hematocrito, relación CMDA, VD/VT y VD/PC.

Los resultados obtenidos en este estudio nos muestran que el peso corporal a nivel del mar fue mayor que en la altura, llegando a obtener pesos de alrededor de 2620 g a nivel del mar al día 40 y de 1716.73 g en altura. Los pesos a nivel del mar se encuentran dentro del rango de pesos normales para la línea según la empresa productora de ésta (Cobb, 2008), y es similar a lo encontrado por otros autores; así también lo encontrado en altura donde se observa una menor ganancia de peso. Vidalón R. (2007) reporta en aves Cobb vantes pesos de 202 g a nivel del mar y de 114.9 en altura a los 7 días; y 3235.1 y 1961 g a los 42 días a nivel del mar y altura respectivamente. Peña (2001), en pollos de carne de la línea Arbor Acres, encontró pesos de 1680 g a nivel del mar y de 1263 g a 3320 m.s.n.m.

La hipoxia produce un aumento marcado del hematocrito llegando a cuadros de policitemia, lo cual está reportado por diferentes autores; esto concuerda con lo encontrado en este trabajo en aves criadas en altura donde los niveles de hematocrito tuvieron un incremento ($p < 0.05$) al día 20 de edad (41.53%), manteniéndose elevado hasta el final de la crianza, por lo tanto se considera que esto podría estar influyendo en el aumento de la viscosidad sanguínea, lo cual estaría incrementando la presión arterial pulmonar por resistencia, y estimulando la remodelación de los vasos lo cual estaría colaborando en la presentación de hipertrofia cardiaca llegando al final a producir cuadros de ascítis en los animales. Cueva y col. (2004) reportaron que aves Cobb vantes de 20 días de edad presentan un hematocrito de 41.53% en comparación con sus pares a nivel del mar (29.13%) y esto coincide con un incremento de la presión arterial pulmonar, 29.63 mmHg en altura y 23.83 mmHg a nivel del mar, haciéndose más notorio en aves de 40 días de edad, donde observaron un hematocrito de 42.12% y presión arterial pulmonar de 45.5 mmHg en altura frente a 20.17 mmHg de nivel del mar con hematocrito similar al de 20 días.

Bernilla (2001) realizó un experimento en pollos de carne de la línea Arbor Acres de 38 días de edad expuestos a 3 días de hipoxia (3320 m.s.n.m.) en los cuales encontró un hematocrito de 39.86% y peso corporal de 2092 g, mientras que Peña (2001), reportó un hematocrito de 31.25% a nivel del mar y de 51.93% en altura, en pollos de 35 días de edad.

Este incremento marcado del hematocrito se debe al incremento de la liberación de eritropoyetina, la cual empieza a partir de las 4 horas de iniciado el cuadro de hipoxia, siendo más evidente en cuadros crónicos, por otro lado al inicio de los cuadros de hipoxia el ON es uno de los factores que estimula la liberación de eritropoyetina por parte del riñón con el objetivo de compensar la deficiencia en la distribución de oxígeno a los tejidos (Yoshioka y Fisher, 1995).

Se sabe que la hipoxia induce el incremento de la liberación de prostaglandinas (PGs) por parte de las células musculares lisas de las arterias pulmonares tales como PGE₂, PGD₂ y la PGF₂ α , siendo esta última un potente vasoconstrictor (Smith *et al.*, 1996; Bradbury *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002). El efecto vasoconstrictor se logra por una disminución del AMPc que ocasiona un aumento de la concentración de calcio intracelular (Haroun *et al.*, 2004). En investigaciones realizadas en diferentes especies animales se ha demostrado que hay un aumento de la presión arterial pulmonar por efecto de la altura (Will *et al.*, 1975; Tucker *et al.*, 1975; Ayón *et al.*, 1979, Cueva *et al.*, 2004) causado inicialmente por la vasoconstricción de las arteriolas pulmonares distales ocasionado por la baja presión de oxígeno y el frío característico de las zonas de altura (Chauca y Bligh, 1976; Ayón y Cueva, 1998; Sylvester, 2001), reportándose que el frío en aves es un factor importante en el desencadamiento de cuadros de hipertensión arterial pulmonar.

Se sabe que la vasoconstricción arteriolar pulmonar hipóxica es un proceso rápido, inicialmente se debe a la liberación de sustancias vasoactivas como prostaglandinas, tromboxanos, los mismos niveles *per se* de oxígeno, el estado redox, lo cual lleva a la inhibición del flujo de K⁺ a través de receptores de membrana celular operados por voltaje o ligando, ocasionando la despolarización, que aumenta la actividad de la Fosfolipasa C para luego aumentar la concentración de calcio intracelular, que unido a la calmodulina activa a la MLC kinasa fosforilando a la miosina para que interactúe con la actina e inicie la contracción muscular. Para la contracción del músculo liso es necesario un mecanismo de sensibilización que consiste en la inhibición de la enzima MLC fosfatasa por parte de la enzima Rho kinasa (Peers, 1997; Dumas *et al.*, 1999; Sylvester, 2001; Webb, 2003). Fagan y col. (2004) demostraron que la vasoconstricción hipóxica pulmonar aguda y crónica se atenúa por inhibición de la Rho kinasa.

Cuando la exposición a la hipoxia ambiental es de mayor duración, otras sustancias vasoactivas toman mayor importancia como la endotelina-1 ya que su síntesis es relativamente lenta y no se encuentra preformada (Barnes, 1994; Celermajer, 1997). La ET-1 actúa a través de la unión con sus receptores en la membrana celular del músculo liso que activa los mecanismos para la contracción muscular; además la ET-1 está involucrada en los procesos mitogénicos vía PkC, activan MAPk que intervienen en la muscularización vascular y refuerzan la hipertensión pulmonar (Hassoun *et al.*, 1992; Brij y Peacock, 1998; Weissmann *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2002). La hipoxia induce la liberación de citoquinas inflamatorias desde la célula endotelial tales como IL-1, IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF α , estando algunas de ellas como la IL-1 β , TNF α , factores de crecimiento, ON y ROS en la activación del HIF-1 (Huang *et al.*, 1996; Hellwig-Bürgel *et al.*, 1999; Pearlstein *et al.*, 2002; Warnholtz *et al.*, 2002) y a nivel del músculo liso arterial disminuye la síntesis de GMPc lo que limitaría la respuesta vasodilatadora del ON (Hassoun *et al.*, 2004).

En este trabajo, los valores de nitritos y nitratos encontrados, que se consideran como metabolitos finales del ON, a nivel del mar mantuvieron un patrón similar desde los 10 días hasta los 40 días (0.7408-08808 μ M), mientras que en altura se encontró que a los 10 días los niveles eran similares a los de sus pares de nivel del mar, para luego tener una disminución marcada 0.5052 μ M ($p < 0.05$) hacia el día 20, lo cual estaría significando una supresión en la producción de ON, lo cual también estaría relacionado al inicio de las modificaciones a nivel arteriolar pulmonar y ventricular. Al día 30 de edad se observa un incremento significativo (1.2142 μ M), el cual está por encima de lo encontrado en sus pares a nivel del mar, lo que hace suponer que estaría relacionado a un incremento en la producción de ON mediante otras vías que podría ser mediante iNOS, y de esta manera estaría produciendo metabolitos en mayor cantidad y de forma sostenida, pero este ON no tendría un efecto dilatador sobre la musculatura lisa, lo cual concuerda con lo reportado por Li y Col (1999) quienes reportan que en ausencia de eNOS, el ON producido por otras vías no tiene efecto vasodilatador. También, estos resultados concuerdan con Fagan y col. (1998) quienes reportan que por efecto de la hipoxia crónica hay una supresión en la expresión de eNOS, mientras que (Jung *et al.*, 2000) indican que en estas condiciones hay sobreexpresión de iNOS.

Vidalón (2007) reporta valores de nitritos y nitratos (μM) en pollos de la línea Cobb vantes a nivel del mar de 0.42 a los 7 días, 0.29 a los 21 días, 0.39 a los 28 días y 0.55 a los 42 días; mientras que en altura (3320 m.s.n.m.) encontró 0.75 (7 días), 0.36 (21 días), 0.11 (28 días) y 0.40 (42 días), lo cual muestra una supresión marcada en la producción de ON hacia los 20 y 30 días de edad, siendo diferente a lo encontrado en este trabajo en el día 30 de edad.

En este estudio se demostró que tanto a nivel del mar como en altura hubo un incremento en la muscularización lo cual se vió reflejado en la relación CM/DA (Cuadro N° 5), en la cual se puede observar que a más edad hay mayor muscularización, en altura se puede explicar como la respuesta vascular a la hipoxia ambiental, mientras que a nivel del mar podría explicarse como una respuesta del organismo para tratar de compensar la alta demanda metabólica del ave sometida a crianza intensiva lo cual estaría avalado por Cortés y col. (2006) quienes demostraron que en los últimos años la selección genética del pollo de engorde ha incrementado su velocidad de crecimiento y depósito de masa muscular que trae como consecuencia un aumento en la carga metabólica debido a la mayor demanda de oxígeno, esto los haría más susceptibles a presentar hipertensión arterial pulmonar, debido a una mayor vasoconstricción y desarrollo muscular liso arteriolar pulmonar.

Arce (1991) y Berger (1992) encuentran que la hipertensión pulmonar esta relacionada a la vasoconstricción, producto de la muscularización de las arteriolas pulmonares y que coincide con los resultados de Hernández (1986) quien también menciona que entre la tercera y quinta semana de edad (21-35 días) hay mayor presentación de hipertensión arterial pulmonar en pollos broilers, etapa en la que se tiene un mayor crecimiento según Mack y Donald (1998) quienes presentan una curva de crecimiento del pollo de engorde que es ascendente hasta la semana 7 (49 días), siendo acelerado entre la tercera y quinta semana (21-35 días).

La relación CM/DA en altura encontrada en este trabajo está entre 0.1069 y 0.1465, que es mayor lo encontrado por Moreno de Sandino y Hernández (2006) en aves Arbor Acres sometidas a hipoxia, quienes obtuvieron valores entre 0.0972 y 0.1193. Montalvo y col. (1979) demostraron que los pollos de carne sometidos a hipoxia ambiental presentan

mayor desarrollo de músculo liso de las arteriolas pulmonares en pollos criados a la misma altitud que los del presente trabajo, pero los valores obtenidos por estos autores están entre 0.114 y 0.113 para machos y hembras respectivamente, los cuales son menores a los encontrados en el presente estudio, esto nos indicaría que con las mejoras genéticas realizadas a los pollos de producción de carne la susceptibilidad y predisposición a desarrollar cuadros de muscularización son mayores debido a su alta tasa metabólica, lo cual se agrava al ser sometidos a hipoxia crónica; esto está avalado por Arce y col. (1988) quienes demostraron en cuatro estirpes diferentes de aves de engorde, que los pollos con menor velocidad de crecimiento presentaron menor hipertensión arterial pulmonar.

Estudios realizados por Hurtado (1995) y Monge y León-Velarde (1991) quienes sometieron crónicamente a animales a bajas presiones de oxígeno (hipoxia de altura) observaron vasoconstricción de las arteriolas pulmonares que dependía del incremento de la capa de músculo liso de dichas arteriolas. Peña y col. (1992), Enkvetchakul y col. (1995) y Giesbrecht (1995) explican que la muscularización de las arteriolas es un proceso de proliferación hipertrófica e hiperplásica de las células musculares lisas; además, Clerk y Sugden (1999), Dennis (2000), Serhan y Oliw (2001) así como Bendall y col. (2002) mediante estudios bioquímicos han podido demostrar que al haber hipoxia tisular crónica, el aumento del grosor de la capa muscular lisa de las arteriolas pulmonares estaría supeditado a la producción de sustancias vasoconstrictoras y/o mitogénicas como endotelina-1, angiotensina II, catecolaminas, prostaglandinas e interleucinas lo cual sumado al estrés de roce sobre la pared vascular a través de Map kinasas estarían induciendo la proliferación del músculo liso de arteriolas y células cardíacas.

Bendall y col. (2002) y Esposito y col. (2001) evidencian la importancia de las Map Kinasas en la activación nuclear para la formación de c-fos y c-jun (*c-fos* y *c-jun* intervienen en la génesis de sarcómeros) a partir de la PA-1 (Proteína Activadora), y por medio del ribosoma 40S van a activar a la kinasa S6 y de allí la síntesis de proteínas que se depositarán en el músculo liso arteriolar produciendo un aumento del grosor de la capa muscular.

La hipertensión arterial pulmonar e hipertrofia de la capa muscular lisa de las arteriolas pulmonares está relacionado a la hipertrofia cardíaca derecha, lo cual

observamos en forma significativa en las aves sometidas a hipoxia ambiental (0.3613 a los 40 días), lo cual es similar a lo reportado por Peña (2001), quien encontró una relación de VD/VT de 0.433 en pollos Arbor acres a 3320 m.s.n.m. La relación VD/PC reportada es de 0.617 a nivel del mar y de 1.774 en altura. Por otro lado, estos valores encontrados son similares a lo encontrado por Sillau y col. (1980), quienes reportaron una relación de 0.35 en aves machos. Por su parte Staub (1963) demuestra que hay una relación directa entre la muscularización de la arteriola pulmonar y el aumento del tamaño del ventrículo derecho en la presentación de la hipertensión arterial pulmonar; además González y col. (1998) al comparar 7 líneas diferentes de pollos encontraron que el ventrículo derecho de la línea Cobb Vantress tiene un peso superior al de la línea Ross, sin embargo la línea Ross era más pesada que la línea Cobb Vantress.

En nuestro estudio al hacer el análisis de correlación encontramos que tanto el tiempo de exposición a la hipoxia (edad del animal) como las variaciones en los niveles de nitritos y nitratos tienen influencia sobre las relaciones CM/DA, VD/VT y VD/PC tanto a nivel del mar como en altura, lo cual nos estaría sugiriendo que la disminución en la producción de óxido nítrico o la producción de éste por estimulación de la iNOS y la no activación de eNOS serían factores importantes en los cuadros de hipertrofia arteriolar pulmonar e hipertrofia cardiaca, lo cual en aves sería crítico debido a que estas están sometidas diariamente a cuadros de hipoxia metabólica.

VI. CONCLUSIONES

1. La hipoxia ambiental (3320 m.s.n.m.) produce una disminución ($p<0.05$) en los niveles de nitritos y nitratos al día 20 de edad y un aumento marcado ($p<0.05$) hacia el día 30 de edad en pollos.
2. Existe una correlación directa entre los niveles de nitritos y nitratos y el tiempo de exposición a la altura con el desarrollo de hipertrofia cardiaca y muscularización de las arteriolas pulmonares en aves de producción de carne.
3. Las aves de nivel del mar presentaron una muscularización de las arteriolas pulmonares similar a la encontrada en aves sometidas a hipoxia ambiental.

VII. LITERATURA CITADA

1. Abi-Gerges N, Szabo G, Otero AS, Fischmeister R, Mery PF. 2002. NO donors potentiate the beta-adrenergic stimulation of ICa, L and the muscarinic activation of IK, ACh in rat cardiac myocytes. *J Physiol*; 540: 411-424.
2. Adams RH. 1988. *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. 5° Ed. Zaragoza (España) Editorial Acribia S.A., 453-462.
3. Agani FH, M Puchowicz, JC Chavez, P Pichiule y J LaManna. 2002. Role of nitric oxide in the regulation of HIF-1 α expression during hypoxia. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*; 283(1): C178-C186.
4. Ahmmed GU, Xu Y, Hong Dong P, Zhang Z, Eiserich J, Chiamvimonvat N. 2001. Nitric oxide modulates cardiac Na⁺ channel via protein kinase A and protein kinase G. *Circ Res*; 89: 1005-1013.
5. Alexander AF, DH Will y JT Reeves. 1960. Pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy in cattle at high altitude. *Am J Vet Res*; 21: 199-204.
6. Alfonso JP, MD Pérez, L Cordiés, HA del Pozo. 1997. Nuevas teorías fisiopatogénicas en hipertensión arterial. *Acta Méd*; 7(1): 36.
7. Ali, MH, SH Schlidt, NS Chandel, KL Hymes, PT Schumacker, BL Gewert. 1999. Endothelial permeability and IL-6 production during hypoxia: role of ROS in signal transduction. *Lung Cell Mol Physiol*; 277(5): L1057-L1065.

8. Andrew PJ y B Mayer. 1999. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc. Res*; 43: 521-531.
9. Arce J, C Magaña, C López, P Vásquez y G Ávila. 1988. Constantes fisiológicas y parámetros productivos de tres líneas comerciales de pollo de engorde y su relación con el síndrome ascítico. *Memorias XIII Convención Nacional de la Asociación Nacional de especialistas en Ciencias Avícolas*. Acapulco Mex., 111-135.
10. Arce J. 1991. Restricción alimenticia para disminuir la ascitis. *Avic Prof*; 8(3): 96-102
11. Archer SL, E Souil, AT Dinh-Xuan, B Schremmer, JC Mercier, A El Yaagoubi, L Nguyen-Huu, HL Reeve y V Hampl. 1998. Molecular identification of the role of voltage-gated K⁺ channels, kv1.5 and Kv2.1, in hypoxic pulmonary vasoconstriction and control of resting membrane potential in rat pulmonary artery myocytes. *J Clin Invest*; 101: 2319-2330.
12. Archer SL, EK Weir, HL Reeve y E Michelakis. 2000. Molecular identification of O₂ sensors and O₂-sensitive potassium channels in the pulmonary circulation. *Adv Exp Med Biol*; 475: 219-240.
13. Archer S y E Michelakis. 2002. The mechanism(s) of hypoxic pulmonary vasoconstriction: Potassium channels, redox O₂ sensors, and controversies. *News Physiol Sci*; 17: 131-137.
14. Ashley EA, CE Sears, SM Bryant, HC Watkins, B Casadei. 2002. Cardiac nitric oxide synthase 1 regulates basal and β-adrenergic contractility in murine ventricular myocytes. *Circulation*; 105: 3011-3016.
15. Ayón M, A Valenzuela y AH Sillau. 1979. Insuficiencia cardiaca congestiva en aves criadas en altura (mal de altura) y su relación con la hipertensión arterial pulmonar por hipoxia. In: *An. VI Cong. Latinoam. Avicultura*. Lima, 130-136.
16. Ayón M y S Cueva. 1998. Adaptación del ganado bovino a la altura. *Pub Téc N°*. 38. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor San Marcos, Lima, 15p
17. Azuma H. 1999. Role of L-arginine-endogenous NOS inhibitors-endothelin-1 pathway for the vascular remodeling. *Nippon Yakurigaku Zasshi*; 114(1) :33P-40P.

18. Babu BR, C Frey, OW Griffith. 1999. L-arginine binding to nitric oxide synthase. The rol of H-bonds to the noreactive guanidium nitrogens. *J Biol Chem*; 274(36): 25218-25226.
19. Bai CX, K Takahashi, H Masumiya, T Sawanobori, T Furukawa. 2004. Nitric oxide-dependent modulation of the delayed rectifier K⁺ current and the L-type Ca²⁺ current by ginsenoside Re, an ingredient of Panax ginseng, in guinea-pig cardiomyocytes. *Br J Pharmacol*; 42: 567-575.
20. Ballinger SW, C Patterson, CN Yan, R Doan, DL Burow, CG Young, FM Yakes, B Van Houten, CA Ballinger, BA Freeman y MS Runge. 2000. Hydrogen peroxide and peroxynitrite induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circ. Res*; 86: 960-966.
21. Barnes PJ. 1994. Endothelins and pulmonary diseases. *J Appl Physiol*; 77: 1051-1059.
22. Barouch LA, RW Harrison, MW Skaf, GO Rosas, TP Cappola, ZA Kobeissi. 2002. Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature*; 416: 337-339.
23. Behrendt D y P Ganz. 2002. Endothelial function: from vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol*; 90 (suppl): 40L–48L
24. Bendall J, C Cave, C Heymes, N Gall y A Shah. 2002. Pivotal role of gp91phox-containing NADPH oxidase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation*, 105: 293-296.
25. Bennie RE, CS Packer, DR Powell, N Jin y RA Rhoades. 1991. Biphasic contractile response of pulmonary artery to hypoxia. *Am J Physiol*; 263: L156-L163.
26. Berger MM. 1992. La restricción alimenticia en el síndrome ascítico en pollos de engorde. *Avic Prof*; 9(3): 12-22.
27. Bernilla de la C SV. 2001. Efecto de la sustancia P sobre la presión arterial pulmonar en pollos expuestos a la altura. Tesis para optar el grado académico de Magister en Salud Animal. *FMV, UNMSM*. 1-65.
28. Bilton RL y GW Booker. 2003. The subtle side to hypoxia inducible factor (HIF)- α regulation. *Eur J Biochem*; 270(5): 791-798.
29. Bishop-Bailey D, T Hla y JA Mitchell. 1999. Cyclooxygenase-2 in vascular smooth muscle. *Int J Mol Med*; 3: 41-48.

30. Bishop J E y G Lindahl. 1999. Regulation of cardiovascular collagen synthesis by mechanical load. *Cardiovasc Res*; 42: 27-44.
31. Blackman DJ, JA Morris, JJ Atherton, GR Ellis, RA Anderson, JR Cockcroft, MP Frenneaux. 2000. Endothelium-derived nitric oxide contributes to the regulation of venous tone in humans. *Circulation*; 101(2): 165-170.
32. Bolli R. 2001. Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research. *J Mol Cell Cardiol*;33:1897-1918.
33. Bradbury DA, R Newton, YM Zhu, J Stocks, L Corbett, ED Holland, LH Pang y AJ Knox. 2002. Effect of bradykinin, TGF-1 β , IL-1 β and hypoxia on COX-2 expression in pulmonary artery smooth muscle cells. *Lung Cell Mol Physiol*; 283: L717-L725.
34. Brahmajothi MV, DL Campbell. 1999. Heterogeneous basal expression of nitric oxide synthase and superoxide dismutase isoforms in mammalian heart: implications for mechanisms governing indirect and direct nitric oxide-related effects. *Circ Res*;85: 575-587.
35. Brij SO y AJ Peacock. 1998. Cellular responses to hypoxia in the pulmonary circulation. *Thorax*; 53: 1075-1079.
36. Brunner F, P Andrew, G Wolkart, R Zechner, B Mayer. 2001. Myocardial Contractile Function And Heart Rate In Mice With Myocyte-Specific Overexpression Of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Circulation*; 104: 3097-3102.
37. Burton R, A Smith, J Carlisle, S Sluka. 1969. Role of hematocrit, heart mass, and high altitude exposure in acute hypoxia tolerance. *J Appl Physiol*; 27: 49-60.
38. Calver A, J Collier, S Moncada, P Vallance. 1992. Effect of local intraarterial N-mono-methyl-L-arginine in patients with hypertension: the nitric oxide dilator mechanism appears abnormal. *J Hypertens*;10: 1025-1031.
39. Campbell DL, JS Stamler, HC Strauss. 1996. Redox modulation of L-type calcium channels in ferret ventricular myocytes. Dual mechanism regulation by nitric oxide and S-nitrosothiols. *J Gen Physiol*;10: 277-293.
40. Cappola T, DA Kass, G Nelson, RD Berger, GO Rosas, Z Kobeissi. 2001. Allopurinol improves myocardial efficiency in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation*;104: 2407-2411.

41. Cardillo C, CM Kilcoyne, AA Quyyumi, RO Canon, JA Panza. 1998. Selective defect in nitric oxide synthesis may explain the impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension. *Circulation*; 97(9): 851-856.
42. Carville C, S Adnot, S Ed dahibi, E Teiger, D Rideau, B Raffestin. 1997. Induction of nitric oxide synthase activity in pulmonary arteries from normoxic and chronically hypoxic rats. *Eur Respir J*; 10: 437-445.
43. Celermajer D. 1997. Endothelial dysfunction: Does it matter? Is it reversible?. *J Am Coll Cardiol*; 30:325-333.
44. Chandel NS, DS McClintock, CE Feliciano, TM Wood, JA Melendez, AM Rodriguez y PT Schumacker. 2000. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: A mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem*; 275: 25130-25138.
45. Chauca D y J Bligh. 1976. Efecto aditivo del frío y la hipoxia sobre la presión arterial pulmonar de ovinos. *Res Vet Sci*; 21: 123-124.
46. Chen Y, JH Traverse, R Du, M Hou, RJ Bache. 2002. Nitric oxide modulates myocardial oxygen consumption in the failing heart. *Circulation*; 106: 273-279.
47. Chien K, K Knowlton, H Zhu y S Chien. 1991. Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy molecular studies of an adaptive physiologic response. *FASEB J*; 5: 3037-3046.
48. Chien K. 1999. Stress pathways and heart failure. *Cell*; 98: 555-558.
49. Chida M y NF Voelkel. 1996. Effects of acute and chronic hypoxia on rat lung cyclooxygenase. *Lung Cell Mol Physiol*; 270: L872-L878.
50. Choate JK, EJ Danson, JF Morris, DJ Paterson. 2001. Peripheral vagal control of heart rate is impaired in neuronal NOS knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 281: H2310-H2317.
51. Christou H, A Yoshida, V Arthur, T Morita y S Kourembanas. 1998. Increased vascular endothelial growth factor production in the lungs of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 18: 768-776.
52. Chrysant S. 1998. Vascular remodelling: the role of angiotensin enzyme inhibitors. *Am Heart J*; 135: S21-S30.
53. Clerk A y P Sugden. 1999. Activation of protein kinase cascades in the heart by hypertrophic G protein-coupled receptor agonists. *Am J Cardiol*; 83: 64H-69H.

54. Cobb. 2008. Suplemento informativo de rendimiento y nutrición del pollo de engorde Cobb700. Publicado en Cobb-vantres.com.
55. Cockcroft JR, PJ Chowienczyk, N Benjamin, JM Ritter. 1994. Preserved endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med*; 330:1036-1040.
56. Cody RJ. 1995. Hypertensive heart disease and heart failure. *Curr Opin Cardiol*; 10: 450-457.
57. Conrad PW, DE Millhorn, D Beitner-Johnson. 2000. Hypoxia Differentially Regulates The Mitogen- And Stress-Activated Protein Kinases. Role Of Ca²⁺/Cam In The Activation Of MAPK And P38 Gamma. *Adv Exp Med Biol*; 475: 293-302.
58. Cooper IV G. 2000. Cardiocyte cytoskeleton in hypertrophied myocardium. *Heart Failure Rev*; 5: 187-201.
59. Córdova A, V Díaz, C Blas, F Arauco. 1981. Estudio de la densidad óptima y sus costos en la crianza de pollos de carne a nivel del valle interandino (2450 m.s.n.m.) Ayacucho. Lib Res IV. Reu Cient Asoc Per Prod Anim.
60. Cortés A, A Estrada, E Ávila. 2006. Productividad y Mortalidad por síndrome ascítico en pollos de engorda alimentados con dietas granuladas y en harina. *Téc Pec Méx*: 44(2): 241-246.
61. Cosby K, KS Partovi KS, JH Crawford, RP Patel, CD Reiter. 2003. Nitrite Reduction To Nitric Oxide By Deoxyhemoglobin Vasodilates The Human Circulation. *Nat Med*; 9: 1498-1505
62. Cosentino F. y TL Lüscher. 1999. Tetrahydrobiopterin and endothelial nitric oxide synthase activity. *Cardiovasc Res*; 43: 274-278.
63. Cueva S, M Vásquez, M Ayón, B Lira. 2004. Rol del óxido nítrico en la presión arterial pulmonar en pollos expuestos a hipoxia de la altura. *XXVII reunión científica anual, APPA*.
64. Damy T, P Ratajczak, E Robidel, JK Bendall, P Oliviero, J Boczkowski. 2003. Up-regulation of cardiac nitric oxide synthase 1-derived nitric oxide after myocardial infarction in senescent rats. *FASEB J*; 17: 1934-1936.
65. Damy T, P Ratajczak, AM Shah, E Camors, I Marty, G Hasenfuss. 2004. Increased neuronal nitric oxide synthase-derived NO production in the failing human heart. *Lancet*; 363: 1365-1367.

66. Dedkova EN y LA Blatter. 2002. Nitric oxide inhibits capacitative Ca²⁺ entry and enhances endoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake in bovine vascular endothelial cells. *J Physiol*; 539: 77-91
67. Dennis EA. 2000. Phospholipase A2 in eicosanoid generation. *Am J Respir Crit Care Med*; 161(Suppl.): S32-S35.
68. Drab M, P Verkade, M Elger, M Kasper, M Lohn, B Lauterbach. 2001. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science*; 293: 2449-2452.
69. Drexler H. 1998. Factors involved in the maintenance of endothelial function. *Am J Cardiol*; 82: 3S-4S.
70. Dumas JP, M Dumas, C Sgro, C Advenier y JF Giudicelli. 1994. Effects of two K⁺ channel openers, aprikalim and pinacidil, on hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Eur J Pharmacol*; 263:17-23.
71. Dumas JP, M Bardou, F Goirand y M Dumas. 1999. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Genral Pharmacol*; 33: 289-297.
72. Earley S y TC Resta. 2002. Estradiol attenuates hypoxia-induced pulmonary endothelin-1 gene expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 283: L86-L93.
73. Earley S, LD Nelin, LG Chicoine y BR Walker. 2002. Hypoxia-induced pulmonary endothelin-1 expression is unaltered by nitric oxide. *J Appl Physiol*; 92: 1152-1158.
74. Ebert BL y HF Bunn. 1999. Regulation of the erythropoietin gene. *Blood*, 94(6):1864-1877.
75. Eddahibi S, B Raffestin, M Clozel, M Levame y S Adnot. 1995. Protection from pulmonary hypertension with an orally active endothelin receptor antagonist in hypoxic rats. *Am J Physiol*; 268: H828-H835.
76. Elfering SL, TM Sarkela, C Giulivi 2002.. Biochemistry Of Mitochondrial Nitric-Oxide Synthase. *J Biol Chem*; 277: 38079-38086.
77. Enkvetchakul B, J Beasley y W Bottje. 1995. Pulmonary arteriole hypertrophy in broilers with pulmonary hypertension syndrome (ascites). *Poultry Science*, 74(10): 1667-1682.
78. Esposito G, S Prasad, A Rapacciuolo, L Mao, WJ Koch y H Rockman. 2001. Cardiac overexpression of a Gq inhibitor blocks induction of extracellular signal-

- regulates kinase and c-Jun NH₂-terminal kinase activity in vivo pressure overload. *Circulation*; 103: 1453-1458.
79. Fagan K, P Huang, I McMurtry y D Rodman. 1998. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) deficient mice have increased sensitivity to hypoxia. *Am J Respir Crit Care Med*; 157: A588.
 80. Fagan KA, M Oka, NR Bauer, SA Gebb, DD Ivy, KG Morris, IF McMurtry. 2004. Attenuation of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction and hypoxic pulmonary hypertension in mice by inhibition of Rho-kinase. *Am J Phys*, 287: L656-664.
 81. Favier R, H Spielvogel, E Caceres, A Rodriguez, B Sempore y JM Pequignot. 1997. Differential effects of ventilatory stimulation by sex hormones and almitrine on hypoxic erythrocytosis. *Pflugers Arc*;, 434(1):97-103.
 82. Feron O, C Dessy, DJ Opel, MA Arstall, RA Kelly, T Michel. 1998. Modulation of the endothelial nitric-oxide synthase-caveolin interaction in cardiac myocytes: implications for the autonomic regulation of heart rate. *J Biol Chem*; 273:30249-30250
 83. Feron O, C Dessy, JP Desager, JL Balligand. 2001. Hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition promotes endothelial nitric oxide synthase activation through a decrease in caveolin abundance. *Circulation*; 10:113-118.
 84. Ferrara N y T Davis-Smyth. 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*; 18:4.
 85. Fiedler B, SM Lohmann, A Smolenski, S Linnemüller, B Pieske, F Schröder, JD Molkentin, H Drexler, KC Wollert. 2002. Inhibition of calcineurin-NFAT hypertrophy signaling by cGMP-dependent protein kinase type I in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*; 99 (17): 11363–11368
 86. Fike CD, MR Kaplowitz, CJ Thomas y LD Nelin. 1998. Chronic hypoxia decreases nitric oxide production and endothelial nitric oxide synthase in newborn pig lungs. *Am J Physiol*; 274: L517-L526.
 87. Fisher JW. 2003. Erythropoietin: Physiology and pharmacology update. *Molecular Interventions*; 2: 229-243.
 88. Fleming I, B Fisslthaler, S Dimmeler, BE Kemp, R Busse. 2001. Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca²⁺/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res*; 88: E68-E75.

89. Forte P, M Copland, L Smith, E Milne, J Sutherland, N Benjamin. 1997. Basal nitric oxide synthesis in essential hypertension. *Lancet*; 349: 837-842.
90. Francia M MM. 2006. Registro de mortalidad, eliminados y descartes a la saca de dos líneas genéticas de pollos de carne. Tesis para optar el título de Médico Veterinario. *FMV-UNMSM*: 1-67.
91. Franco-Obregon A y J Lopez-Barneo. 1996a. Low P_{O2} inhibits calcium channel activity in arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol*; 271: H2290-H2299.
92. Franco-Obregon A y J Lopez-Barneo. 1996b. Differential oxygen sensitivity of calcium channels in rabbit smooth muscle cells of conduit and resistance pulmonary arteries. *J Physiol*; 491: 511-518.
93. Fujishima H, OR Sanchez, CO Bingham, BK Lam, ASapirstein, JV Bonventre, KF Austen y JP Arm. 1999. Cytosolic phospholipase A2 is essential for both the immediate and the delayed phases of eicosanoid generation in mouse bone marrow-derived mast cells. *Proc Natl Acad Sci*; 96: 4803-4807.
94. Fulton D, JP Gratton, TJ McCabe, J Fontana, Y Fujio, K Walsh. 1999. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*; 399: 597-601.
95. Fulton D, A Papapetropoulos, X Zhang, JD Catravas, TH Hintze, WC Sessa. 2000. Quantification of eNOS mRNA in the canine cardiac vasculature by competitive PCR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 278: H658-H665.
96. Gallardo MJM. 1999. Óxido nítrico: método de Griess. Laboratorio de Toxicología CIBIOR-IMSS.
97. Gauthier C, D Langin, JL Balligand. 2000. β 3-Adrenoceptors in the cardiovascular system. *Trends Pharmacol Sci*; 21: 426-431.
98. Ge RL, S Witkowski, Y Zhang, C Alfrey, M Sivieri, T Karlsen, GK Resaland, M Harber, J Stray-Gundersen y BD Levine. 2002. Determinants of erythropoietin release in response to short-term hypobaric hypoxia. *J Appl Physiol*; 92: 2361-2367.
99. Giesbrecht G. 1995. The respiratory system in a cold environment. *Avian Soace Environ Med*; 66 (9): 890-902.
100. Gonzáles E, J Buyse, T Sayuri, J Sartori y E Decuypere. 1998. Metabolic Disturbances in Male Broilers of Different Strains. Performance, Mortality, and Right Ventricular Hypertrophy. *Poultry Science*; 77: 1646-1653.

101. Gorlach A, I Diebold, VB Schini-Kerth, U Berchner-Pfannschmidt, U Roth, RP Brandes, T Kietzmann y R Busse. 2001. Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22 (phox)-containing NADPH oxidase. *Circ Res*; 89: 47-54.
102. Green LC, DA Wagner, J Glogowski, PL Skipper, JS Wishnok, SR Tannenbaum. 1982. Analysis of nitrate, nitrite and (¹⁵N) nitrate in biological fluids. *Ann Biochem*; 126: 131-138.
103. Gyurko R, P Kuhlencordt, MC Fishman, PL Huang. 2000. Modulation of mouse cardiac function in vivo by eNOS and ANP. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 278: H971-H981.
104. Haddad JJ. 2002. Oxygen-Sensing Mechanisms And The Regulation Of Redox-Responsive Transcription Factors In Development And Pathophysiology. *Respir Res*; 3: 26.
105. Hampl V y J Herget. 2000. Role of nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary hypertension. *Physiol Rev*; 80(4): 1337-1372.
106. Han X, Y Shimoni, WR Giles. 1995. A cellular mechanism for nitric oxide-mediated cholinergic control of mammalian heart rate. *J Gen Physiol*; 106: 45-65.
107. Han X, L Kobzik, JL Balligand, RA Kelly, TW Smith. 1996. Nitric oxide synthase (NOS3)-mediated cholinergic modulation of Ca²⁺ current in adult rabbit atrioventricular nodal cells. *Circ Res*; 78: 998-1008
108. Han J, N Kim, H Joo, E Kim, YE Earm. 2002. ATP-sensitive K⁺ channel activation by nitric oxide and protein kinase G in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 283: H1545- H1554.
109. Hanson WL, Boggs DF, Kay JM, Hofmeister SE, Okada O, Wagner WW Jr. 2000. Pulmonary Vascular Response Of The Coati To Chronic Hypoxia. *J Appl Physiol*; 88(3): 981-986.
110. Hare JM. 2003. Nitric oxide and excitation-contraction coupling. *J Mol Cell Cardiol*; 35: 719-729.
111. Hare JM, JS Stamler. 2005. NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system. *J Clin Invest*; 115: 509-517.
112. Harris P y D Heath. 1986. Influence of respiratory gases. En: Harris, P. y D. Heath. (Eds.). The human pulmonary circulation, 2da. Ed. Churchill Livingstone, London, pp. 456-483.

113. Harning B y H Drexler. 1997. Endotelial function and bradykinin in humans. *Drugs*; 54(Suppl 15): 42-47.
114. Haroun HE, D Bradbury, A Clayton y AJ Knox. 2004. Interleukin-1 β , transforming growth factor- β_1 , and bradykinin attenuate cyclic AMP production by human pulmonary artery smooth muscle cells in response to prostacyclin analogues and prostaglandin E₂ by cyclooxygenase-2 induction and downregulation of adenylyl cyclase isoforms 1, 2, and 4. *Circ Res*; 94: 353.
115. Hassoun PM, V Thappa, MJ Landman y BL Fanburg. 1992. Endothelin 1: mitogenic activity on pulmonary artery smooth muscle cells and release from hypoxic endothelial cells. *Proc Soc Exp Biol Med*; 199: 165-170.
116. Hassoun PM, G Filippov, M Fogel, C Donaldson, US Kayyali, LA Shimoda y KD Bloch. 2004. Hypoxia decreases of soluble guanylate cyclase in cultured rat pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 30: 908-913.
117. Haynes WG, FE Strachan y DJ Webb. 1995. Endothelin ET_A and ET_B receptors cause vasoconstriction of human resistance and capacitance vessels in vivo. *Circ*; 92: 357-363.
118. Hellwig-Bürigel T, K Rutkowski, E Metzen, J Fandrey y W Jelkmann. 1999. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood*; 94(5): 1561-1567.
119. Hernández V. 1986. La ascitis hipóxica en pollos: Influencia y posibles soluciones. *Memorias del VI Seminario Internacional de Patología Aviar*, 4(4): 152-153.
120. Heymes C, M Vanderheyden, JG Bronzwaer, AM Shah, WJ Paulus. 1999. Endomyocardial nitric oxide synthase and left ventricular preload reserve in dilated cardiomyopathy. *Circulation*; 99: 3009-3016.
121. Hintze TH, H Tada, KE Loke y FA Recchia. 1999. Contribution of nitric oxide to the control of cardiac oxygen and substrate consumption during the development of heart failure. *J Cardiac Failure*; 5(Supp2): 23.
122. Hohenhaus E, A Paul, RE McCullough, H Kucherer y P Bartsch. 1995. Ventilatory and pulmonary vascular response to hypoxia and susceptibility to high altitude pulmonary edema. *Eur Respir J*; 8(11): 1825-1833.

123. Hu J, DJ Discher, NH Bishopric y KA Webster. 1998. Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand. *Biochem Biophys Res Commun*; 245: 894-899.
124. Huang LE, Z Arany, DM Livingston y HF Bunn. 1996. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem*; 271: 32253-32259.
125. Hunter J, A Grace y K Chien. 1999. Molecular and cellular biology of cardiac hypertrophy and failure. In *Molecular basis of cardiovascular disease*. USA Circulation, 211-250.
126. Hurtado G. 1995. Insuficiencia cardiaca en el lactante por hipertensión arterial pulmonar e hipoxia de altura. *Rev Ins Med Sucre*, 60 (106-107): 51-65.
127. Ichinose F, R Ullrich, A Sapirstein, RC Jones, JV Bonventre, CN Serhan, KD Bloch y WM Zapol. 2002. Cytosolic phospholipase A2 in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Clin Invest*; 109(11): 1493-1500.
128. Ide H, H Nakano, T Ogasa, S Osana, K Kikuchy, J Iwamoto. 1999. Regulation of pulmonary circulation by alveolar oxygen tension via airway nitric oxide. *J Appl Physiol*; 87(5): 1629-1636.
129. Intengan H y E Schiffrin. 1999. Collagen degradation is diminished in mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats after hypertension is established. *Hypertension*, 43: 329.
130. Intengan H y E Schiffrin. 2000. Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. *Hypertension*, 36: 312-318.
131. Ito H, M Hiroe, Y Hirata, M Tsujino, S Adachi, M Shichiri, A Koike, A Nogami y F Marumo. 1993. Insulin-like growth factor-I induces hypertrophy with enhanced expression of muscle specific genes in cultured rat cardiomyocytes. *Circulation*, 87: 1715-1721.
132. Ivan M, K Kondo, H Yang, W Kim, J Valiando, M Ohh, A Salic, JM Asara, WS Lane y WG Kaelin Jr. 2001. HIF- α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: Implications for O₂ sensing. *Science*, 292: 464-468.
133. Jaakkola P, DR Mole, YM Tian, MI Wilson, J Gielbert, SJ Gaskell, A Kriegsheim, HF Hebestreit, M Mukherji, CJ Schofield, PH Maxwell, CW Pugh y PJ Ratcliffe.

2001. Targeting of HIF- α to the Von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂ regulated prolyl hydroxylation. *Science*, 292: 468-472.
134. Jones MK, K Tsugawa, AS Tarnawski, D Baatar. 2004. Dual actions of nitric oxide on angiogenesis: possible roles of PKC, ERK, and AP-1. *Biochem Biophys Res Commun*; 318: 520-528.
135. Jung F, LA Palmer, Nan Zhou, RA Johns. 2000. Hypoxic regulation of inducible nitric oxide synthase via hypoxia inducible factor-1 in cardiac myocytes. *Circulation research*; 86 (3): 319-325.
136. Julian RJ. 1993. Ascites in poultry. *Avian Pathol*; 22:419-454.
137. Julian RJ y G Diaz. 1999. La fisiología del pollo de engorde del futuro. *Mundo avícola y porcino* N° 32: 12-13.
138. Karakurum M, R Shreeniwas, J Chen, D Pinsky, SD Yan, M Anderson, K Sunouchi, J Major, T Hamilton, K Kuwabara. 1994. Hypoxic induction of interleukin-8 gene expression in human endothelial cells. *J Clin Invest*; 93: 1564-1570.
139. Kamm KE y JT Stull. 1985. The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 25: 593–620.
140. Kamm KE y JT Stull. 2001. Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions. *J Biol Chem*; 276: 4527–4530.
141. Kaye DM, SD Wiviott, RA Kelly. 1999. Activation of nitric oxide synthase (NOS3) by mechanical activity alters contractile activity in a Ca²⁺-independent manner in cardiac myocytes: role of troponin I phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*; 256: 398-403.
142. Kelly RA, JL Balligand, TW Smith. 1996. Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res*; 79: 363-380.
143. Khan SA, MW Skaf, RW Harrison, K Lee, KM Minhas, A Kumar. 2003. Nitric oxide regulation of myocardial contractility and calcium cycling: independent impact of neuronal and endothelial nitric oxide synthases. *Circ Res*; 92: 1322-1329.
144. Kim H, S Dalal, E Young, M Legato, M Weisfeldt, J D'armiento. 2000. Disruption of the myocardial extracellular matrix leads to cardiac dysfunction. *J Clin Invest*; 106: 857-866.

145. King AP, P Smith y D Health. 1995. Ultrastructure of rat pulmonary arterioles after neonatal exposure to hypoxia and subsequent relief and treatment with monocrotaline. *J Pathol*; 177(1): 71-81.
146. Kobzik L, DS Bredt, CJ Lowenstein, J Drazen, B Gaston, D Sugarbaker y JS Stamler. 1993. Nitric oxide synthase in human and rat lung: Immunohistochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 9: 371-377.
147. Lando D, JJ Gorman, ML Whitelaw y DJ Peet. 2003. Oxygen-dependent regulation of hypoxia-inducible factors by prolyl and asparaginyl hydroxylation. *Eur J Biochem*; 270(5): 781-790.
148. Landmesser U, F Bahlmann, M Mueller, S Spiekermann, N Kirchhoff, S Schulz. 2002. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure-role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation*; 106: 3073-3078.
149. Layland J, JM Li, AM Shah. 2002. Role of cyclic GMP-dependent protein kinase in the contractile response to exogenous nitric oxide in rat cardiac myocytes. *J Physiol*; 540: 457-467.
150. Lee SL, WW Wang, JJ Lanzillo y BL Fanburg. 1994. Regulation of serotonin-induced DNA synthesis of bovine pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol*; 266: L53-L60.
151. Levesque H, N Cailleux, H Courtois. 1994. Peptide vasoactif d'origine endothéliale. Perspectives thérapeutiques. *Presse Med*; 23: 1172-1177.
152. Li D, N Zhou, RA Johns. 1999. Soluble guanylate cyclase gene expression and localization in rat lung after exposure to hypoxia. *Lung Cell Mol Physiol*; 277(4): L841-L847.
153. Liu Y, S Cox, T Morita y S Kourembanas. 1995. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. *Circ Res*, 77: 638-643.
154. López-Coello C, CL Casas, LM Paasch. 1982. Efecto de la Altura sobre la presentación del síndrome ascítico. *Memorias I reunión de Investigación Pecuaria en México*. México D.F.: 214-217.
155. López-Coello C. 1997. Susceptibilidad al síndrome ascítico de diferentes estirpes genéticas de pollos de engorde. Tesis de Doctorado. México, D.F: *Universidad Nacional Autónoma de México*.

156. Loscalzo J. 1995. Nitric oxide and vascular disease. *N Engl J Med*; 333: 251-253.
157. Luscher TF y RR Wenzel. 1995. Endothelial and endothelin antagonists: Pharmacology and Clinical implications. *Agents Actions Suppl*, 45: 237-253.
158. Luscher TF y M Barton. 1997. Biology of the endothelium. *Clin Cardiol*; 20 (11 Suppl 2): II-3-10.
159. Mack ON y D Donald. 1998. Manual de Producción Avícola. 3ª Ed. Manual Moderno Ed., 427-434.
160. Madden JA, M Vadula y V Kurup 1992. Effects of hypoxia and other vasoactive agents on pulmonary and cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 263: L384–L393.
161. Maloney CG, WA Kutchera, KH Albertine, TM McIntyre, SM Prescott y GA Zimmerman. 1998. Inflammatory agonists induce cyclooxygenase type 2 expression by human neutrophils. *J Immunol*, 160: 1402-1410.
162. Manukhina EB, I Malyshev, I Arkhipenko. 2000. Nitric Oxide In The Cardiovascular System: Its Role In Adaptive Protection. *Vestn Ross Akad Med Nauk*; (4): 16-21.
163. Marletta MA, MATayeh, JM Hevel. 1990. Unraveling the biological significance of nitric oxide. *Biofactors*; 2: 219.
164. Marletta MA. 1993. Nitric Oxide Synthase Structure And Mechanism. *J Biol Chem*; 268(17): 12231-12234.
165. Massion PB y Balligand JL. 2003. Modulation of cardiac contraction, relaxation and rate by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS): lessons from genetically modified mice. *J Physiol*; 546: 63-75
166. Massion PB, O Feron, C Dessy, JL Balligan. 2003. Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ Res*; 93: 388-398.
167. Maxwell HR y CW Robertson. 2000. Cardiovascular disease in poultry: epidemiology-current trends and correlates. *International Poultry Congress*. Montreal, Canada: 1-10.
168. Maxwell HR y CW Robertson. 2001. Encuesta mundial de ascítis: parte 2. *Industria avícola*. 48(10): 16-27.
169. Mazzeo RS, A Child, GE Butterfield, JT Mawson, S Zamudio y LG Moore. 1998. Catecholamine response during 12 days of high-altitude exposure (4300m.) in women. *Blood*; 84(4): 1151-1157.

170. Meade EA, DA Jones, GA Zimmerman; TM McIntyre y SM Prescott. 1996. Prostaglandins and related compounds: lipid messengers with many actions. *Handbook of Lipid Research*, Chapter 9, Vol. 8. Lipid Second Messengers. R.M. Bell; J.H. Exton; S.M. Prescott, eds. *Plenum Press*, New York, p. 285.
171. Mery P-F, SM Lohmann, U Walter, R Fischmeister. 1991. Ca²⁺ current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*; 88:1197-201
172. Michell BJ, MB Harris, ZP Chen, H Ju, VJ Venema, MA Blackstone. 2002. Identification of regulatory sites of phosphorylation of the bovine endothelial nitric-oxide synthase at serine 617 and serine 635. *J Biol Chem*; 277: 42344-42351
173. MINAG. 2005. Producción pecuaria: Aves. Disponible en: www.portalagrario.gob.pe/pec_real.shtml (agosto 2005).
174. Minet E, T Arnould, G Michel, I Roland, D Mottet, M Raes, J Remacle y C Michiels. 2000. ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation. *FEBS Lett*; 468: 53-58.
175. Miranda KM, MG Espey, DA Wink. 2001. A rapid simple spectrophometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*; 5(1): 62-71.
176. Miyamoto A, U Laufs, C Pardo, JK Liao. 1997. Modulation of bradykinin receptor ligand binding affinity and its coupled G-proteins by nitric oxide. *J Biol Chem*; 272: 19601-19608.
177. Mizuguchi T, M Nishiyama, K Moroi, H Tanaka, T Saito, Y Masuda, T Masaki, D de Wit, M Yanagisawa y S Kimura. 1997. Analysis of two pharmacologically predicted endothelin B receptor subtypes by using the endothelin B receptor gene knockout mouse. *Br J Pharmacol*; 120: 1427-1430.
178. Mohan P, DL Brutsaert, WJ Paulus, SU Sys. 1996. Myocardial contractile response to nitric oxide and cGMP. *Circulation*; 93: 1223-1229.
179. Monge CC y F Leon-Velarde. 1991. Physiological adaptation to high altitude: Oxygen transport in mammals and birds. *Physio Rev*; 71: 1135-1172.
180. Moniotte S, L Kobzik, O Feron, JN Trochu, C Gauthier, JL Balligand. 2001. Upregulation of β_3 -adrenoceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium. *Circulation*; 103: 1649-1655.

181. Montalvo C, M Ayón, H Sillau. 1979. Histología de las arteriolas pulmonares en aves a nivel del mar y en la altura (3300 m). *Res VI Cong. Latinoam. Avicultura*, Lima. 146.
182. Moreno de Sandino M y A Hernández. 2006. Pulmonary Arteriole Remodeling in Hypoxic Broilers Expressing Different Amounts of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Poultry Science*; 85: 899–901
183. Moreno de Sandino M y A Hernández. 1996. La hipertensión pulmonar en pollos de engorde. Patogénesis, Control y perspectivas de Investigación. *Rev de CEISA*; 3(1): 65-79.
184. Mulvany M, G Baumbach, C Aalkajer. 1996. Vascular remodelling. *Hypertension*; 28: 505-506.
185. Murray T, L Chen, B Marshall y E Macarak. 1990. Hypoxic contraction of cultured pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 3: 457–465.
186. Musialek P, M Lei, HF Brown, DJ Paterson, B Casadei. 1997. Nitric oxide can increase heart rate by stimulating the hyperpolarization-activated inward current. *Circ Res*; 81: 60-68.
187. National Heart, Lung and Blood Institute (NBHLI). 1994. Role of nitric oxide in the pathogenesis of lung disease. Clinical studie: 94-H-0141.
188. Nishida CR y PR Ortiz de Montellano. 1999. Autoinhibition of endothelial nitric-oxide synthase. Identification of an electron transfer control element. *J Biol Chem*; 274: 14692-14698.
189. Nisoli E, S Falcone, C Tonello, V Cozzi, L Palomba, M Fiorani. 2004. Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA*; 101: 16507-16512.
190. Ng LC, SM Wilson, JR Hume. 2005. Mobilization of SR stores by hypoxia leads to consequent activation of capacitative Ca²⁺ entry in isolated canine pulmonary arterial smooth muscle cells. *J Physiol*; 563: 409–419.
191. Noel-Jorand MC y H Burnet. 1994. Changes in human respiratory sensation induced by acute high altitude hypoxia. *Neuroreport*; 5(3): 1561-1566.
192. Núñez L, R Gómez, M Vaquero, A García-Méndez, R Caballero, A López-Farré. 2005. Effects of nitric oxide on a human atrial potassium channel (hKv1.5). *Eur Heart J*; 26 Suppl: 453.

193. Odom TW y WM Chilian. 1993. Pulmonary Vascular Growth Is Attenuated Relative to Somatic Growth In Young Broiler Chickens. *PSA*; Vol. 72(1): 106.
194. Opie LH. 1998. The Heart. Physiology, from cell to circulation. *Lipincott-Raven, New York*: 393
195. Ou LC, S Salceda, SJ Schuster, LM Dunnack, T Brink-Johnsen, J Chen y JC Leiter. 1998. Polycythemic responses to hypoxia: molecular and genetic mechanisms of chronic mountain sickness. *J Appl Physiol*; 84: 1242-1251.
196. Parekh AB y R Penner. 1997. Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev*; 77: 901-930.
197. Parekh AB y JW Putney Jr. 2005. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev*; 85: 757-810.
198. Park DS, SE Woodman, W Schubert, AW Cohen, PG Frank, M Chandra. 2002. Caveolin-1/3 double-knockout mice are viable, but lack both muscle and non-muscle caveolae, and develop a severe cardiomyopathic phenotype. *Am J Pathol*; 160: 2207-2217.
199. Patel AJ, M Lazdunski y E Honoré. 1997. Kv2.1/Kv9.3, a novel ATP-dependent delayed rectifier K⁺ channel in oxygen-sensitive pulmonary artery myocytes. *EMBO J*; 16: 6615-6625.
200. Paton JF, S Kasparov, DJ Paterson. 2002. Nitric oxide and autonomic control of heart rate: a question of specificity. *Trends Neurosci*; 25: 626-631.
201. Paulus WJ y JG Bronzwaer. 2004. Nitric oxide's role in the heart: control of beating or breathing?. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 287: H8-H13.
202. Pearlstein DP, MH Ali, PT Mungai, KL Hynes, BL Gewertz y PT Schumacker. 2002. Role of mitochondrial oxidant generation in endothelial cell response to hypoxia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 22: 566-573.
203. Peers C. 1997. Oxygen-sensitive ion channels. *Trends Pharmacol Sci*; 18: 405-408.
204. Peña TL. 2001. Efecto de la L-arginina sobre la relación ventrículo derecho/ventrículo total y el hematocrito en pollos de carne en la altura. Tesis para optar el título de Médico Veterinario. FMV-UNMSM. 1-37.
205. Peña J, AS Aluja, R Navarro. 1992. Insuficiencia cardiaca congestiva derecha en becerras Holstein de reemplazo I-II. *Clínica y Patología Vet Max*; XXIII: 2.

206. Perez A, A Rodriguez, VM Sanjurjo, R Padrón. 1997. El papel del oxido nítrico en la hemodinámica, hemostasia e inflamación. *Ev Cuvana Estomatol*; 34(2): 84-86.
207. Pernow J, L Kaijser, JM Lundberg y G Ahlborg. 1996. Comparable potent coronary constrictor effects of endothelin-1 and Big endothelin-1 in humans. *Circ*; 94: 2077-2082.
208. Pinsky DJ, S Patton, S Mesaros, V Brovkovich, E Kubaszewski, S Grunfeld. 1997. Mechanical transduction of nitric oxide synthesis in the beating heart. *Circ Res*; 81: 372-³⁷⁹.
209. Ploog HP. 1982. Efecto de la altura en pollos broilers. *Ovonoticias*; 48: 48-51.
210. Post JM, CH Gelband y JR Hume. 1995. $[Ca^{2+}]_i$ inhibition of K^+ channels in canine pulmonary artery. Novel mechanism for hypoxia-induced membrane depolarization. *Circ Res*; 77: 131-139.
211. Prabhu SD, B Chandrasekar, DR Murray, GL Freeman. 2000. β -Adrenergic blockade in developing heart failure: effects on myocardial inflammatory cytokines, nitric oxide, and remodeling. *Circulation*; 101: 2103-2109.
212. Raychaudhuri B, R Dweik, MJ Connors, L Buhrow, A Malur, J Drazba, AC Arroliga, SC Erzurum, MS Kavuru y MJ Thomassen. 1999. Nitric oxide blocks nuclear factor- κ B activation in alveolar macrophages. *Am J. Respir Cell Mol Biol*; 21: 311-316.
213. Reeve HL, EK Weir, DP Nelson, DA Peterson y SL Archer. 1995. Opposing effects of oxidants and antioxidants on K^+ channel activity and tone in rat vascular tissue. *Exp Physiol*; 80: 825-834.
214. Reeve HL, SL Archer y EK Weir. 1997. Ion channels in the pulmonary vasculature. *Pulm Pharmacol Ther*; 10: 234-252.
215. Reeves JT, EB Grover y RF Grover. 1963. Pulmonary circulation and oxygen transport in lambs at high altitude. *J Appl Physiol*; 18: 560-566.
216. Ren J, X Zhang, GI Scott, LB Esberg, BH Ren, B Culver, AF Chen. 2004. Adenovirus gene transfer of recombinant endothelial nitric oxide synthase enhances contractile function in ventricular myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol*; 43: 171-177.

217. Richard DE, E Berra, J Pouyssegur. 2000. Nonhypoxic Pathway Mediates The Induction Of Hypoxia-Inducible Factor 1alpha In Vascular Smooth Muscle Cells. *J Biol Chem*; 275(35): 26765-26771.
218. Roberts JD, CT Roberts, RC Jones, WM Zapol y KD Bloch. 1995. Continuous nitric oxide inhalation reduces pulmonary arterial structural changes, right ventricular hypertrophy, and growth retardation in the hypoxic newborn rat. *Circ Res*; 76: 215-222.
219. Rodriguez A. 1994. Impacto económico del síndrome ascítico en Colombia. En avances en la Investigación sobre el síndrome ascítico. *Memorias de la Universidad nacional, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia*, Santa Fe de Bogotá. Colombia.
220. Rosenberger C, S Mandriota, JS Jurgensen, MS Wiesener, JH Horstrup, U Frei, PJ Ratcliffe, PH Maxwell, S Bachmann y KU Eckardt. 2002. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α and -2 α in hypoxic and ischemic rat kidneys. *J Am Soc Nephrol*; 13(7): 1721-1732.
221. Roush WB y RF Wideman. 2000. Evaluation of growth velocity and acceleration in relation to pulmonary hypertension syndrome. *Poultry Sci*; 79: 180-191.
222. Saavedra WF, N Paolocci, ME St John, MW Skaf, GC Stewart, JS Xie. 2002. Imbalance between xanthine oxidase and nitric oxide synthase signaling pathways underlies mechanoenergetic uncoupling in the failing heart. *Circ Res*; 90: 297-304.
223. Sandau KB, HG Faus y B Brune. 2000. Induction of hypoxia-inducible-factor-1 by nitric oxide is mediated via the PI 3K pathway. *Biochem Biophys Res Commun*; 278: 263-267.
224. Sandau KB, J Fandrey y B Brüne. 2001. Accumulation of HIF-1 α under the influence of nitric oxide. *Blood*; 97(4): 1009-1015.
225. Sato J, K Nair, J Hiddinga, NL Eberhardt, LA Fitzpatrick, ZS Katusic, T O'Brien. 2000. eNOS gene transfer to vascular smooth muscle cells inhibits cell proliferation via upregulation of p27 and p21 and not apoptosis. *Cardiovasc Res*; 47(4): 697-706.
226. Schechter AN y MT Gldwin. 2003. Hemoglobin and the paracrine and endocrine functions of nitric oxide. *N Engl J Med*; 348: 1483-1485.

227. Schilling J, P Kolzer, M Guggembach, D Gyurech, K Maralhia, S Geroulanos. 1994. Reduced endogenous nitric oxide in the exhaled air of smokers and hypertensives. *Eur Respir J*; 7: 467-471.
228. Scheele CW, E Decuyper, PF Vereijken, FJ Schreurs. 1992. Ascites In Broilers. Disturbances In The Hormonal Regulation Of Metabolic Rate And Fat Metabolism. *Poult Sci*; 46: 1971-1984.
229. Schlaich MP y RE Schmieder. 1998. Left Ventricular Hypertrophy And Its Regression: Pathophysiology And Therapeutic Approach: Focus On Treatment By Antihypertensive Agents. *Am J Hypertens*; 11(11 Pt 1): 1394-1404.
230. Schulz R, T Rassaf, PB Massion, M Kelm, JL Balligand. 2005. Recent advances in the understanding of the role of nitric oxide in cardiovascular homeostasis. *Pharmacol Ther*; 108: 225-256.
231. Sears CE, EA Ashley, B Casadei. 2004. Nitric oxide control of cardiac function: is neuronal nitric oxide synthase a key component?. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*; 359: 1021-1044.
232. Semenza GL. 2001a. Hypoxia-inducible factor-1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol Med*; 7: 345-350.
233. Semenza GL. 2001b. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol*; 13: 167-171.
234. Serhan CN y E Oliw. 2001. Unorthodox routes to prostanoid formation: New twists in cyclooxygenase-initiated pathways. *J Clin Invest*; 107(12): 1481-1489.
235. Sham JS. 2002. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. Ups and downs of reactive oxygen species. *Circ Res*; 91: 649-651.
236. Sheta EA; H Trout; JJ Gildea; MA Harding y D Theodorescu. 2001. Cell density mediated pericellular hypoxia leads to induction of HIF-1 α via nitric oxide and Ras/MAP kinase mediated signaling pathways. *Oncogene*; 20: 7624-7634.
237. Shimoyama M, D Hayashi, E Takimoto, Y Zou. 1999. Calcineurin plays a critical role in pressure-overload-induced cardiac hypertrophy. *Circulation*; 100: 2449-2454.
238. Shinke T, H Takaoka, M Takeuchi, K Hata, H Kawai, H Okubo. 2000. Nitric oxide spares myocardial oxygen consumption through attenuation of contractile response to β -adrenergic stimulation in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation*; 101: 1925-1930.

239. Sillau A, S Cueva y P Morales. 1980. Pulmonary arterial in male and female chickens at 3300 m. *Pflügers Arch*; 386: 269-275.
240. Sinha AK, S Bhattacharya, K Acharya, S Mazumder. 1999. Stimulation Of Nitric Oxide Synthesis And Protective Role Of Insulin In Acute Thrombosis In Vivo. *Life Sci*; 65(25): 2687-2696.
241. Smith WL, RM Garavito y DL DeWitt. 1996. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem*; 271: 33157-33160
242. Somlyo AP y AV Somlyo. 2003. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev*; 83: 1325–1358.
243. Stamler JS, S Lamas, FC Fang. 2001. Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell*;106: 675-683.
244. Staub N. 1963. Site of action of hypoxia on the pulmonary vasculature. *Fed. Proc*; 22: 453.
245. Steudel W, F Ichinose, PL Huang, WE Hurford, RC Jones, JA Bevan, MC Fishman y WM Zapol. 1997. Pulmonary vasoconstriction and hypertension in mice with targeted disruption of the endothelial nitric oxide synthase (NOS3) gene. *Circ Res*; 81: 34-41.
246. Steudel W, M Scherrer-Crosbie, KD Bloch, J Weimann, PL Huang, RC Jones, MH Picard y WM Zapol. 1998. Sustained pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy after chronic hypoxia in mice with congenital deficiency of nitric oxide synthase 3. *J Clin Invest*; 101: 2468-2477
247. Stuehr DJ y OW Griffith. 1992. Mammalian nitric oxide synthases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*; 65: 287-346.
248. Sugden PH y MA Bogoyevitch. 1996. Endothelin-1-dependent signaling pathways in the myocardium. *Trends Cardiovasc Med*; 6: 87-94.
249. Sunada Y, H Ohi, A Hase, H Ohi, T Hosono, S Arata. 2001. Transgenic mice expressing mutant caveolin-3 show severe myopathy associated with increased nNOS activity. *Human Mol Genet*; 10: 173-178.
250. Sylvester J, A Harabin, M Peake y R Frank. 1980. Vasodilator and constrictor responses to hypoxia in isolated pig lungs. *J Appl Physiol Respir Environ Exercise Physiol*; 49: 820–825.

251. Sylvester JT. 2001. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. A radical view. *Circ Res*; 88: 1228-1230.
252. Sylvester JT, JS Sham, LA Shimoda y Q Liu. 2001. Cellular mechanisms of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction. In: Scharf, S.M.; M.R. Pinsky; S. Magder Eds. *Respiratory-Circulatory Interactions in Health and Disease*, New York. 351-359.
253. Sylvester JT. 2004. The tone of pulmonary smooth muscle: ROK and Rho music?. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L624–L630.
254. Tarumoto T, S Imagawa, K Ohmine, T Nagai, M Higuchi, N Imai, N Suzuki, M Yamamoto y K Ozawa. 2000. NG-monomethyl-L-arginine inhibits erythropoietin gene expression by stimulating GATA-2. *Blood*; 96(5): 1716-1722.
255. Trochu JN, JB Bouhour, G Kaley, TH Hintze. 2004. Role Of Endothelium-Derived Nitric Oxide In The Regulation Of Cardiac Oxygen Metabolism: Implications In Health And Disease. *Circulation*; 110: 856-861.
256. Tucker A, IF McMurtry, JT Reeves, AF Alexander, DH Will y RF Grover. 1975. Lung vascular smooth muscle as a determinant of pulmonary hypertension at high altitude. *Am J Physiol*; 228(3): 762-767.
257. Ungureanu-Longrois D, JL Balligand, WW Simmons, I Okada, L Kobzik, CJ Lowenstein. 1995. Induction of nitric oxide synthase activity by cytokines in ventricular myocytes is necessary but not sufficient to decrease contractile responsiveness to β -adrenergic agonists. *Circ Res*; 77: 494-502.
258. Uzun O, AT Demiryurek y I Kanzik. 1998. The role of tyrosine kinase in hypoxic constriction of sheep pulmonary artery rings. *Eur J Pharmacol*; 358: 41-47.
259. Varghese P, RW Harrison, RA Lofthouse, D Georgakopoulos, DE Berkowitz, JM Hare. 2000. β 3-Adrenoceptor deficiency blocks nitric oxide-dependent inhibition of myocardial contractility. *J Clin Invest*; 106: 697-703.
260. Verhaar MC, FE Strachan, DE Newby, NL Cruden, HA Koomans, TJ Rabelink y DJ Webb. 1998. Endothelin-A receptor antagonist-mediated vasodilation is attenuated by inhibition of nitric oxide synthesis and by endothelin-B receptor blockade. *Circ*; 97: 752-756
261. Veyssier-Belot C y P Cacoub. 1999. Role of endothelial and smooth muscle cells in the physiopathology and treatment management of pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res*; 44: 274-282.

262. Vidalón DR. 2007. El nitrito como posible donador de óxido nítrico para prevenir la presentación de casos de ascitis en pollos de broiler en la altura. Tesis para optar el título de Médico Veterinario. *FMV-UNMSM*. 1-39.
263. Vila-Petroff MG, A Younes, J Egan, EG Lakatta, SJ Sollott. 1999. Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes. *Circ Res*; 84: 1020-1031.
264. Voelkel NF y RM Tuder. 1997. Cellular and molecular biology of vascular smooth muscle cells in pulmonary hypertension. *Pulm Pharmacol Ther*; 10: 231-241.
265. Vogel J, I Kiessling, K Heinicke, T Stallmach, P Ossent, O Vogel, M Aulmann, Frietsch, H Schmid-Schonbein, W Kuschinsky y M Gassmann. 2003. Transgenic mice overexpressing erythropoietin adapt to excessive erythrocytosis by regulating blood viscosity. *Blood*; 102(6): 2278-2284.
266. Walker R. 1993. Combatiendo ascitis en los intestinos. *Industria Avícola*; 40(7): 18-19.
267. Wang J, M Juhaszova, LJ Rubin y XY Yuan. 1997. Hypoxia inhibits gene expression of voltage-gated K⁺ channel α subunits in pulmonary artery smooth muscle cells. *J Clin Invest*; 100: 2347-2353.
268. Wang Y, S Huang, V Sah, J Ross, J Brown, J Han y K Chien. 1998. Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by protein kinase family. *J Biol Chem*; 273: 2161-2168.
269. Wang Z, MC Lanner, N Jin, D Swartz, L Li, RA Rhoades. 2003. Hypoxia inhibits myosin phosphatase in pulmonary arterial smooth muscle cells: role of Rho-kinase. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 29: 465-471.
270. Wang J, LA Shimoda, L Weigand, W Wang, D Sun, JT Sylvester. 2005. Acute hypoxia increases intracellular [Ca²⁺] in pulmonary arterial smooth muscle by enhancing capacitative Ca²⁺ entry. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 288: L1059-L1069.
271. Ward JP y PI Aaronson. 1999. Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction: can anyone be right?. *Respir Physiol*; 115: 261-271.
272. Ward JP, GA Knock, VA Snetkov, PI Aaronson. 2004. Protein kinases in vascular smooth muscle tone—role in the pulmonary vasculature and hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Pharmacol Ther*; 104: 207-231.

273. Warnholtz A, M Wendt y T Münzel. 2002. When sleeping beauty turns ugly: mitochondria in hypoxia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 22: 525-527.
274. Waypa GB, NS Chandel y PT Schumacker. 2001. Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing. *Circ Res*; 88: 1259-1266.
275. Webb RC. 2003. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ*; 27(4): 201-206.
276. Weigand L, J Foxson, J Wang, LA Shimoda, JT Sylvester. 2005. Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction by antagonists of store-operated Ca₂⁺ and nonselective cation channels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 289: L5-L13.
277. Weir EK y SL Archer. 1995. The mechanism of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Journal Fed of Am Soc Exp Bio*; 183-189.
278. Weissmann N, R Voswinckel, T Hardebusch, S Rosseau, HA Ghofrani, R Schermuly, W Seeger y F Grimminger. 1999. Evidence for a role of protein kinase C in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 276: L90-L95.
279. Weissmann N, F Grimminger, A Olschewski y W Seeger. 2001. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: a multifactorial response?. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 281: L314-L317
280. Wen FQ; K Watanabe; M Yoshida. 1998. Eicosanoid Profile In Cultured Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells Treated With IL-1 Beta And TNF Alpha. *Prostaglandins, Leukotrienes, And Essential Fatty Acids*; 59(1): 71-75.
281. Wenger RH. 2000. Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *J Exp Biol*; 203: 1253-1263.
282. Wenger RH. 2002. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEBJ*; 16(10): 1151-1162.
283. Wideman RF. 2000. Pathophysiology of heart/lung disorders. *International Poultry Congress*. Montreal, Canada: 11-20.
284. Will DH, AF Alexander, JT Reeves y RF Grover. 1962. High altitude induced pulmonary hypertension in normal cattle. *Cir Res*; 10: 172-177.
285. Will DH, JL Hicks, CS Card y AF Alexander. 1975. Inherited susceptibility of cattle to high-altitude pulmonary hypertension. *J Appl Physiol*; 38(3): 491-494.

286. Woodman SE, DS Park, AW Cohen, MW Cheung, M Chandra, J Shirani. 2002. Caveolin-3 knock-out mice develop a progressive cardiomyopathy and show hyperactivation of the p42/44 MAPK cascade. *J Biol Chem*; 277: 38988-38997.
287. Xia Z, M Dickens, J Raingeaud, R Davis y M Greenberg. 1995. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*; 270: 1326-1331.
288. Xu L, JP Eu, G Meissner, JS Stamler. 1998. Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science*; 279: 234-237.
289. Xu KY, DL Huso, TM Dawson, DS Bredt, LC Becker. 1999. Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA*; 96: 657-662.
290. Yamashita K, DJ Discher, J Hu, NH Bishopric y KA Webster. 2001. Molecular regulation of the endothelin-1 gene by hypoxia. Contributions of hypoxia-inducible factor-1, activator protein-1, GATA-2 and p300/CBP. *J Biol Chem*; 276: 12645-12653.
291. Yamasigawa M y H Kurihara. 1988. Novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*; 40: 1-12.
292. Yamazaki T, I Komuro y S Kudoh. 1996. Endothelin-1 is involved in mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem*; 271: 3221-3228.
293. Yang X, KKK Sheares, N Davie, PD Upton, GW Taylor, J Horsley, J Wharton y NW Morrell. 2002. Hypoxic induction of COX-2 regulates proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 27: 688-696.
294. Yoshioka K y J Fisher. 1995. Nitric oxide enhancement of erythropoietin production in the isloted perfused rat kidney. *Am J Physiol*; 38: C917-C922.
295. Yuan Y, G Hilliard, T Ferguson y DE Millhorn. 2003. Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor and Von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-1. *J Biol Chem*; 278: 15911-15916.
296. Zahradnikova A, I Minarovic, RC Venema, LG Meszaros. 1997. Inactivation of the cardiac ryanodine receptor calcium release channel by nitric oxide. *Cell Calcium*; 22: 447-454

297. Zaobornyj T, LB Valdez, P La Padula, LE Costa, A Boveris. 2005. Effect of sustained hypobaric hypoxia during maturation and aging on rat myocardium. II. mtNOS activity. *J Appl Physiol*; 98: 2370-2375.
298. Zhao Y, R Rhoades y C Packer. 1996. Hypoxia-induced pulmonary arterial contraction appears to be dependent on myosin light chain phosphorylation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 271: L768–L774.
299. Zhao YY, Y Liu, RV Stan, L Fan, Y Gu, N Dalton. 2002. Defects in caveolin-1 cause dilated cardiomyopathy and pulmonary hypertension in knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA*; 99:11375-11380.
300. Ziolo MT, LS Maier, V Piacentino 3rd, J Bossuyt, SR Houser, DM Bers. 2004. Myocyte nitric oxide synthase 2 contributes to blunted beta-adrenergic response in failing human hearts by decreasing Ca²⁺ transients. *Circulation*; 109: 1886-1891.
301. Zundel W, C Schindler, D Haas-Kogan, A Koong, F Kaper, E Chen, AR Gottschalk, HE Ryan, RS Johnson, AB Jefferson, D Stokoe y AJ Giaccia. 2000. Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev*; 14: 391-396.

VIII. ANEXOS

Cuadro N° 1: Relación ventrículo izquierdo / ventrículo total

Grupo	Edad				
	1 día	10 días	20 días	30 días	40 días
Nivel del mar	0.8827 ± 0.042	0.8078 ± 0.027	0.7809 ± 0.054	0.7978 ± 0.023	0.7591 ± 0.049
Altura	0.8827 ± 0.042	0.7371 ± 0.028	0.6950 ± 0.071	0.6417 ± 0.048	0.6387 ± 0.045

Cuadro N° 2: Relación ventrículo izquierdo / peso corporal

Grupo	Edad				
	1 día	10 días	20 días	30 días	40 días
Nivel del mar	0.0036526	0.0044436	0.0036948	0.0028771	0.0026958
Altura	0.0036526	0.0047029	0.0034522	0.0031187	0.0028766

Cuadro N° 3: Relación ventrículo total / peso corporal

Grupo	Edad				
	1 día	10 días	20 días	30 días	40 días
Nivel del mar	0.0041533	0.0055005	0.0047331	0.003608	0.0035583
Altura	0.0041533	0.0063855	0.0049116	0.004847	0.0044974

Cuadro N° 4: Valores de peso, hematocrito (Ht), niveles de nitritos y nitratos (NN), peso de ventrículo derecho (VD), peso de ventrículo izquierdo (VI), peso ventrículo total (VT), relación ventrículo derecho/ventrículo total (VD/VT), relación ventrículo izquierdo/ventrículo total (VI/VT), relación ventrículo derecho/peso corporal (VD/PC), relación ventrículo izquierdo/peso corporal (VI/PC), relación ventrículo total/peso corporal (VT/PC) en pollos Cobb vantes de 1 día de edad.

Ave	Peso	Ht	NN	VD	VI	VT	VD/VT	VI/VT	VD/PC	VI/PC	VT/PC
1	57.5	26	0.0000	0.0563	0.2111	0.2674	0.21055	0.78945	0.00097913	0.0036713	0.00465043
2	56.6	24	0.0000	0.0272	0.1920	0.2192	0.12409	0.87591	0.00048057	0.00339223	0.00387279
3	58.3	20	0.0000	0.0351	0.1855	0.2206	0.15911	0.84089	0.00060206	0.00318182	0.00378388
4	56.6	25	0.0000	0.0302	0.1968	0.2270	0.13304	0.86696	0.00053357	0.00347703	0.0040106
5	55.1	24	0.0000	0.0260	0.1949	0.2209	0.11770	0.88230	0.00047187	0.00353721	0.00400907
6	52.6	26	0.0000	0.0281	0.1843	0.2124	0.13230	0.86770	0.00053422	0.0035038	0.00403802
7	60.6	24	0.0000	0.0132	0.2077	0.2209	0.05976	0.94024	0.00021782	0.00342739	0.00364521
8	58.1	20	0.0000	0.0300	0.2219	0.2519	0.11909	0.88091	0.00051635	0.00381928	0.00433563
9	61.1	25	0.0000	0.0218	0.2350	0.2568	0.08489	0.91511	0.00035679	0.00384615	0.00420295
10	55.6	24	0.0000	0.0275	0.2117	0.2392	0.11497	0.88503	0.0004946	0.00380755	0.00430216
11	53.5	26	0.0000	0.0056	0.1507	0.1563	0.03583	0.96417	0.00010467	0.00281682	0.0029215
12	57.3	24	0.0000	0.0310	0.2529	0.2839	0.10919	0.89081	0.00054101	0.00441361	0.00495462
13	49.9	20	0.0000	0.0233	0.2048	0.2281	0.10215	0.89785	0.00046693	0.00410421	0.00457114
14	55.8	25	0.0000	0.0488	0.2451	0.2939	0.16604	0.83396	0.00087455	0.00439247	0.00526703
15	54.7	24	0.0000	0.0184	0.1859	0.2043	0.09006	0.90994	0.00033638	0.00339854	0.00373492

Cuadro N° 5: Valores de peso, hematocrito (Ht), niveles de nitritos y nitratos (NN), peso de ventrículo derecho (VD), peso de ventrículo izquierdo (VI), peso ventrículo total (VT), relación ventrículo derecho/ventrículo total (VD/VT), relación ventrículo izquierdo/ventrículo total (VI/VT), relación ventrículo derecho/peso corporal (VD/PC), relación ventrículo izquierdo/peso corporal (VI/PC), relación ventrículo total/peso corporal (VT/PC) en pollos Cobb vantes de 10 días de edad criados a nivel del mar.

Ave	Peso	Ht	NN	VD	VI	VT	VD/VT	VI/VT	VD/PC	VI/PC	VT/PC
1	161	32	0.60	0.1912	0.7719	0.9631	0.19853	0.80147	0.00118758	0.00479441	0.00598199
2	210	30	0.90	0.1713	0.8145	0.9858	0.17377	0.82623	0.00081571	0.00387857	0.00469429
3	173	34	0.65	0.1703	0.6031	0.7734	0.22020	0.77980	0.00098439	0.00348613	0.00447052
4	182	30	0.975	0.2307	0.7658	0.9965	0.23151	0.76849	0.00126758	0.00420769	0.00547527
5	198	28	0.7875	0.1803	0.8628	1.0431	0.17285	0.82715	0.00091061	0.00435758	0.00526818
6	187	31	0.70	0.1808	0.8604	1.0412	0.17365	0.82635	0.00096684	0.00460107	0.00556791
7	195	30	0.725	0.2085	0.8862	1.0947	0.19046	0.80954	0.00106923	0.00454462	0.00561385
8	205	30	0.862	0.2913	0.9026	1.1939	0.24399	0.75601	0.00142098	0.00440293	0.0058239
9	167	29	0.85	0.1643	0.8713	1.0356	0.15865	0.84135	0.00098383	0.00521737	0.0062012
10	206	27	0.862	0.2341	0.9906	1.2247	0.19115	0.80885	0.00113641	0.00480874	0.00594515
11	166	25	0.437	0.1449	0.7408	0.8857	0.16360	0.83640	0.00087289	0.00446265	0.00533554
12	217	29	0.787	0.252	0.9561	1.2081	0.20859	0.79141	0.00116129	0.00440599	0.00556728
13	143	27	0.487	0.1162	0.6526	0.7688	0.15114	0.84886	0.00081259	0.00456364	0.00537622
14	192	29	0.787	0.2072	0.8576	1.0648	0.19459	0.80541	0.00107917	0.00446667	0.00554583
15	192	31	0.70	0.2275	0.8555	1.0830	0.21006	0.78994	0.0011849	0.00445573	0.00564063

Cuadro N° 6: Valores de peso, hematocrito (Ht), niveles de nitritos y nitratos (NN), peso de ventrículo derecho (VD), peso de ventrículo izquierdo (VI), peso ventrículo total (VT), relación ventrículo derecho/ventrículo total (VD/VT), relación ventrículo izquierdo/ventrículo total (VI/VT), relación ventrículo derecho/peso corporal (VD/PC), relación ventrículo izquierdo/peso corporal (VI/PC), relación ventrículo total/peso corporal (VT/PC) en pollos Cobb vantes de 20 días de edad criados a nivel del mar.

Ave	Peso	Ht	ON	VD	VI	VT	VD/VT	VI/VT	VD/PC	VI/PC	VT/PC
1	582	28	1.275	0.6232	2.3924	3.0156	0.20666	0.79334	0.00107079	0.00411065	0.00518144
2	655	27	1.037	0.7266	2.6178	3.3444	0.21726	0.78274	0.00110931	0.00399664	0.00510595
3	659	27	0.687	0.7993	2.4496	3.2489	0.24602	0.75398	0.0012129	0.00371715	0.00493005
4	739	33	0.80	0.8733	3.0587	3.932	0.22210	0.77790	0.00118173	0.00413897	0.0053207
5	846	30	0.787	0.7489	3.3211	4.070	0.18400	0.81600	0.00088522	0.00392565	0.00481087
6	670	30	0.625	0.4998	2.1748	2.6746	0.18687	0.81313	0.00074597	0.00324597	0.00399194
7	723	29	0.437	0.6173	2.5125	3.1298	0.19723	0.80277	0.0008538	0.0034751	0.00432891
8	655	27	0.575	0.7071	2.3701	3.0772	0.22979	0.77021	0.00107954	0.00361847	0.00469802
9	751	33	0.80	0.6532	2.9038	3.557	0.18364	0.81636	0.00086977	0.00386658	0.00473635
10	689	28	0.725	0.7479	2.8262	3.5741	0.20926	0.79074	0.00108549	0.00410189	0.00518737
11	774	29	0.487	0.6668	2.7124	3.3792	0.19732	0.80268	0.0008615	0.00350439	0.00436589
12	665	27	0.95	0.5233	2.1278	2.6511	0.19739	0.80261	0.00078692	0.0031997	0.00398662
13	570	33	0.725	1.048	1.5456	2.5936	0.40407	0.59593	0.0018386	0.00271158	0.00455018
14	712	28	1.037	0.6339	2.6412	3.2751	0.19355	0.80645	0.00089031	0.00370955	0.00459986
15	656	28	1.05	0.7230	2.6896	3.4126	0.21186	0.78814	0.00110213	0.0041	0.00520213

Cuadro N° 7: Valores de peso, hematocrito (Ht), niveles de nitritos y nitratos (NN), peso de ventrículo derecho (VD), peso de ventrículo izquierdo (VI), peso ventrículo total (VT), relación ventrículo derecho/ventrículo total (VD/VT), relación ventrículo izquierdo/ventrículo total (VI/VT), relación ventrículo derecho/peso corporal (VD/PC), relación ventrículo izquierdo/peso corporal (VI/PC), relación ventrículo total/peso corporal (VT/PC) en pollos Cobb vantes de 30 días de edad criados a nivel del mar.

Ave	Peso	Ht	ON	VD	VI	VT	VD/VT	VI/VT	VD/PC	VI/PC	VT/PC
1	1530	27	0.575	1.1349	4.1176	5.2525	0.21607	0.78393	0.00074176	0.00269124	0.00343301
2	1460	28	0.85	0.9699	4.6498	5.6197	0.17259	0.82741	0.00066432	0.00318479	0.00384911
3	1480	26	0.85	0.9589	4.2466	5.2055	0.18421	0.81579	0.00064791	0.00286932	0.00351723
4	1420	29	0.95	1.120	3.9152	5.0352	0.22243	0.77757	0.00078873	0.00275718	0.00354592
5	1500	28	0.95	0.9553	3.9785	4.9338	0.19362	0.80638	0.00063687	0.00265233	0.0032892
6	1410	30	0.587	1.0228	3.8364	4.8592	0.21049	0.78951	0.00072539	0.00272085	0.00344624
7	940	33	0.962	0.7002	2.7926	3.4928	0.20047	0.79953	0.00074489	0.00297085	0.00371574
8	1520	28	0.925	0.8129	4.062	4.8749	0.16675	0.83325	0.0005348	0.00267237	0.00320717
9	1640	29	1.15	1.2992	4.6241	5.9233	0.21934	0.78066	0.0007922	0.00281957	0.00361177
10	1550	28	0.65	1.048	4.3499	5.3979	0.19415	0.80585	0.00067613	0.00280639	0.00348252
11	1610	28	1.15	1.0799	4.6865	5.7664	0.18727	0.81273	0.00067075	0.00291087	0.00358161
12	1530	30	0.575	1.1423	4.2338	5.3761	0.21248	0.78752	0.0007466	0.00276719	0.00351379
13	1700	30	1.05	1.8917	5.6863	7.578	0.24963	0.75037	0.00111276	0.00334488	0.00445765
14	1710	27	1.037	1.2334	5.8936	7.127	0.17306	0.82694	0.00072129	0.00344655	0.00416784
15	1550	29	0.95	1.1762	3.9406	5.1168	0.22987	0.77013	0.00075884	0.00254232	0.00330116

Cuadro N° 8: Valores de peso, hematocrito (Ht), niveles de nitritos y nitratos (NN), peso de ventrículo derecho (VD), peso de ventrículo izquierdo (VI), peso ventrículo total (VT), relación ventrículo derecho/ventrículo total (VD/VT), relación ventrículo izquierdo/ventrículo total (VI/VT), relación ventrículo derecho/peso corporal (VD/PC), relación ventrículo izquierdo/peso corporal (VI/PC), relación ventrículo total/peso corporal (VT/PC) en pollos Cobb vantes de 40 días de edad criados a nivel del mar.

Ave	Peso	Ht	ON	VD	VI	VT	VD/VT	VI/VT	VD/PC	VI/PC	VT/PC
1	2010	27	0.70	1.7204	6.5577	8.2781	0.20783	0.79217	0.00085592	0.00326254	0.00411846
2	2908	25	0.825	1.8632	7.2663	9.1295	0.20409	0.79591	0.00064072	0.00249873	0.00313944
3	2419	29	0.80	2.18	5.7017	7.8817	0.27659	0.72341	0.0009012	0.00235705	0.00325825
4	2639	30	0.662	2.4656	7.366	9.8316	0.25078	0.74922	0.00093429	0.00279121	0.0037255
5	2788	27	0.80	2.3369	7.9939	10.3308	0.22621	0.77379	0.0008382	0.00286725	0.00370545
6	2694	28	0.775	2.3523	7.4208	9.7731	0.24069	0.75931	0.00087316	0.00275457	0.00362773
7	2807	25	0.85	2.3536	8.0921	10.4457	0.22532	0.77468	0.00083848	0.00288283	0.0037213
8	2995	30	0.90	2.8277	8.22	11.0477	0.25595	0.74405	0.00094414	0.00274457	0.00368871
9	2347	24	0.825	1.9593	6.4025	8.3618	0.23432	0.76568	0.00083481	0.00272795	0.00356276
10	2627	35	0.75	3.9851	6.9305	10.9156	0.36508	0.63492	0.00151698	0.00263818	0.00415516
11	2567	27	0.875	1.909	6.584	8.493	0.22477	0.77523	0.00074367	0.00256486	0.00330853
12	2614	30	0.80	2.5799	6.9026	9.4825	0.27207	0.72793	0.00098695	0.00264063	0.00362758
13	2567	30	0.662	1.6432	7.0451	8.6883	0.18913	0.81087	0.00064012	0.00274449	0.00338461
14	2719	28	0.80	2.4187	5.977	8.3957	0.28809	0.71191	0.00088955	0.00219823	0.00308779
15	2599	27	0.875	1.296	7.1833	8.4793	0.15284	0.84716	0.00049865	0.00276387	0.00326252

Cuadro N° 9: Valores de peso, hematocrito (Ht), niveles de nitritos y nitratos (NN), peso de ventrículo derecho (VD), peso de ventrículo izquierdo (VI), peso ventrículo total (VT), relación ventrículo derecho/ventrículo total (VD/VT), relación ventrículo izquierdo/ventrículo total (VI/VT), relación ventrículo derecho/peso corporal (VD/PC), relación ventrículo izquierdo/peso corporal (VI/PC), relación ventrículo total/peso corporal (VT/PC) en pollos Cobb vantes de 10 días de edad criados en altura (3320 m.s.n.m.).

Ave N°	Peso	Ht	ON	VD	VI	VT	VD/VT	VI/VT	VD/PC	VI/PC	VT/PC
1	104	28	0.9625	0.1587	0.4702	0.6289	0.25235	0.74765	0.00152596	0.00452115	0.00604712
2	104	29	0.575	0.1451	0.4658	0.6109	0.23752	0.76248	0.00139519	0.00447885	0.00587404
3	127	33	0.925	0.2366	0.5836	0.8202	0.28847	0.71153	0.00186299	0.00459528	0.00645827
4	115	37	0.60	0.2313	0.5104	0.7417	0.31185	0.68815	0.0020113	0.00443826	0.00644957
5	115	27	0.662	0.2026	0.5513	0.7539	0.26874	0.73126	0.00176174	0.00479391	0.00655565
6	95	40	0.975	0.2001	0.4444	0.6445	0.31047	0.68953	0.00210632	0.00467789	0.00678421
7	105	31	0.825	0.1642	0.5198	0.684	0.24006	0.75994	0.00156381	0.00495048	0.00651429
8	108	33	0.60	0.196	0.5043	0.7003	0.27988	0.72012	0.00181481	0.00466944	0.00648426
9	130	41	0.625	0.2175	0.5501	0.7676	0.28335	0.71665	0.00167308	0.00423154	0.00590462
10	106	32	0.775	0.152	0.4588	0.6108	0.24885	0.75115	0.00143396	0.0043283	0.00576226
11	103	39	0.95	0.1341	0.491	0.6251	0.21453	0.78547	0.00130194	0.00476699	0.00606893
12	116	32	1.075	0.2241	0.6337	0.8578	0.26125	0.73875	0.0019319	0.00546293	0.00739483
13	117	41	1.05	0.1743	0.581	0.7553	0.23077	0.76923	0.00148974	0.00496581	0.00645556
14	112	33	0.575	0.1717	0.5218	0.6935	0.24758	0.75242	0.00153304	0.00465893	0.00619196
15	118	35	0.875	0.2163	0.5904	0.8067	0.26813	0.73187	0.00183305	0.00500339	0.00683644

Cuadro N° 10: Valores de peso, hematocrito (Ht), niveles de nitritos y nitratos (NN), peso de ventrículo derecho (VD), peso de ventrículo izquierdo (VI), peso ventrículo total (VT), relación ventrículo derecho/ventrículo total (VD/VT), relación ventrículo izquierdo/ventrículo total (VI/VT), relación ventrículo derecho/peso corporal (VD/PC), relación ventrículo izquierdo/peso corporal (VI/PC), relación ventrículo total/peso corporal (VT/PC) en pollos Cobb vantes de 20 días de edad criados en altura (3320 m.s.n.m.).

Ave N°	Peso	Ht	ON	VD	VI	VT	VD/VT	VI/VT	VD/PC	VI/PC	VT/PC
1	420	40.00	0.325	0.6448	1.3178	1.9626	0.32854	0.67146	0.00153524	0.00313762	0.00467286
2	473	43.08	0.825	0.6027	0.5117	1.1144	0.54083	0.45917	0.00127421	0.00108182	0.00235603
3	391	46.00	0.35	0.8568	1.4869	2.3437	0.36558	0.63442	0.0021913	0.00380281	0.00599412
4	415	43.10	0.80	0.552	1.2963	1.8483	0.29865	0.70135	0.00133012	0.00312361	0.00445373
5	355	47.46	0.40	0.5206	1.3083	1.8289	0.28465	0.71535	0.00146648	0.00368535	0.00515183
6	413	33.90	0.375	0.5624	1.5346	2.097	0.26819	0.73181	0.00136174	0.00371574	0.00507748
7	455	36.23	0.825	0.6264	1.6241	2.2505	0.27834	0.72166	0.0013767	0.00356945	0.00494615
8	445	39.58	0.587	0.6822	1.8837	2.5659	0.26587	0.73413	0.00153303	0.00423303	0.00576607
9	400	49.02	0.65	0.5114	1.3323	1.8437	0.27738	0.72262	0.0012785	0.00333075	0.00460925
10	387	43.18	0.45	0.5616	1.4327	1.9943	0.28160	0.71840	0.00145116	0.00370207	0.00515323
11	412	44.44	0.40	0.557	1.4927	2.0497	0.27175	0.72825	0.00135194	0.00362306	0.004975
12	381	43.24	0.45	0.4839	1.3698	1.8537	0.26105	0.73895	0.00127008	0.00359528	0.00486535
13	380	36.54	0.44	0.4251	1.2616	1.6867	0.25203	0.74797	0.00111868	0.00332	0.00443868
14	374	39.22	0.35	0.6093	1.5952	2.2045	0.27639	0.72361	0.00162914	0.00426524	0.00589439
15	389	37.93	0.35	0.6706	1.3991	2.0697	0.32401	0.67599	0.00172391	0.00359666	0.00532057

Cuadro N° 11: Valores de peso, hematocrito (Ht), niveles de nitritos y nitratos (NN), peso de ventrículo derecho (VD), peso de ventrículo izquierdo (VI), peso ventrículo total (VT), relación ventrículo derecho/ventrículo total (VD/VT), relación ventrículo izquierdo/ventrículo total (VI/VT), relación ventrículo derecho/peso corporal (VD/PC), relación ventrículo izquierdo/peso corporal (VI/PC), relación ventrículo total/peso corporal (VT/PC) en pollos Cobb vantes de 30 días de edad criados en altura (3320 m.s.n.m.).

Ave N°	Peso	Ht	ON	VD	VI	VT	VD/VT	VI/VT	VD/PC	VI/PC	VT/PC
1	1060	37.00	1.325	1.6	3.3827	4.9827	0.32111	0.67889	0.00150943	0.00319123	0.00470066
2	867	37.5	1.4125	1.1989	2.9159	4.1148	0.29136	0.70864	0.00138281	0.00336321	0.00474602
3	1007	39.36	0.85	1.8405	3.6255	5.466	0.33672	0.66328	0.00182771	0.0036003	0.005428
4	984	43.48	0.962	1.7915	2.738	4.5295	0.39552	0.60448	0.00182063	0.00278252	0.00460315
5	906	39.00	0.825	1.8305	2.4887	4.3192	0.42381	0.57619	0.00202042	0.00274691	0.00476733
6	1112	40.95	0.90	1.491	2.8688	4.3598	0.34199	0.65801	0.00134083	0.00257986	0.00392068
7	707	39.00	1.05	1.3708	2.1165	3.4873	0.39308	0.60692	0.0019389	0.00299364	0.00493253
8	957	38.95	1.075	2.0964	2.8447	4.9411	0.42428	0.57572	0.0021906	0.00297252	0.00516311
9	919	53.7	1.237	1.716	3.1514	4.8674	0.35255	0.64745	0.00186725	0.00342916	0.00529641
10	1065	37.00	1.325	1.5841	3.0911	4.6752	0.33883	0.66117	0.00148742	0.00290244	0.00438986
11	767	34.26	1.825	1.3037	1.917	3.2207	0.40479	0.59521	0.00169974	0.00249935	0.00419909
12	805	37.5	1.412	1.5326	2.0967	3.6293	0.42229	0.57771	0.00190385	0.0026046	0.00450845
13	941	37.5	1.40	1.6385	4.1409	5.7794	0.28351	0.71649	0.00174123	0.00440053	0.00614176
14	1017	41.27	1.20	1.6474	3.4407	5.0881	0.32378	0.67622	0.00161986	0.00338319	0.00500305
15	901	40.27	1.412	1.4181	3.0007	4.4188	0.32092	0.67908	0.00157392	0.00333041	0.00490433

Cuadro N° 12: Valores de peso, hematocrito (Ht), niveles de nitritos y nitratos (NN), peso de ventrículo derecho (VD), peso de ventrículo izquierdo (VI), peso ventrículo total (VT), relación ventrículo derecho/ventrículo total (VD/VT), relación ventrículo izquierdo/ventrículo total (VI/VT), relación ventrículo derecho/peso corporal (VD/PC), relación ventrículo izquierdo/peso corporal (VI/PC), relación ventrículo total/peso corporal (VT/PC) en pollos Cobb vantes de 40 días de edad criados en altura (3320 m.s.n.m.).

Ave N°	Peso	Ht	ON	VD	VI	VT	VD/VT	VI/VT	VD/PC	VI/PC	VT/PC
1	1757	47.30	0.95	3.4956	5.6694	9.165	0.38141	0.61859	0.00198953	0.00322675	0.00521628
2	1823	48.10	0.6875	3.2965	5.4363	8.7328	0.37748	0.62252	0.00180828	0.00298206	0.00479035
3	1952	43.33	0.825	3.2414	6.9262	10.1676	0.31880	0.68120	0.00166055	0.00354826	0.00520881
4	1777	45.45	0.825	3.0141	4.0431	7.0572	0.42710	0.57290	0.00169617	0.00227524	0.00397141
5	1872	36.14	0.525	2.3226	5.1572	7.4798	0.31052	0.68948	0.00124071	0.00275491	0.00399562
6	1757	41.43	0.70	2.7415	5.0706	7.8121	0.35093	0.64907	0.00156033	0.00288594	0.00444627
7	1874	46.07	0.4125	3.1717	5.1192	8.2909	0.38255	0.61745	0.00169248	0.0027317	0.00442417
8	1952	34.67	0.5875	2.6833	5.1706	7.8539	0.34165	0.65835	0.00137464	0.00264887	0.00402351
9	1777	41.67	0.825	2.5019	5.728	8.2299	0.30400	0.69600	0.00140793	0.00322341	0.00463134
10	1787	37.35	0.575	3.3258	5.0943	8.4201	0.39498	0.60502	0.00186111	0.00285076	0.00471186
11	1574	42.68	0.525	3.2835	4.6874	7.9709	0.41194	0.58806	0.00208609	0.00297802	0.0050641
12	1101	38.20	1.4375	1.4837	3.8229	5.3066	0.27960	0.72040	0.00134759	0.00347221	0.0048198
13	1453	44.68	0.775	2.3265	3.6715	5.998	0.38788	0.61212	0.00160117	0.00252684	0.00412801
14	1767	40.66	0.825	2.5047	5.0952	7.5999	0.32957	0.67043	0.00141749	0.00288353	0.00430102
15	1528	53.19	0.75	2.3978	3.3003	5.6981	0.42081	0.57919	0.00156924	0.00215988	0.00372912

Cuadro N° 13: Relación grosor de la capa músculo liso/diámetro arteriolar en pollos Cobb vantes de 1 días de edad criados a nivel del mar.

Arteriola N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.085714	0.10000	0.057471	0.115385	0.133333	0.14000	0.121622	0.104651	0.130435	0.086957
2	0.10000	0.095238	0.111111	0.111111	0.111111	0.12500	0.142857	0.090909	0.125000	0.088889
3	0.12069	0.130435	0.111111	0.10000	0.118421	0.115385	0.083333	0.15000	0.081633	0.116667
4	0.105263	0.147059	0.086957	0.096154	0.116667	0.094595	0.096154	0.105263	0.147059	0.086957
5	0.068966	0.10000	0.090909	0.092593	0.084746	0.12000	0.132075	0.130435	0.10000	0.105882
6	0.083333	0.114286	0.125000	0.104167	0.117647	0.09375	0.090909	0.095238	0.085714	0.117647
7	0.230769	0.214286	0.08000	0.064103	0.075000	0.074074	0.078125	0.102564	0.111111	0.085714
8	0.138889	0.105263	0.142857	0.080000	0.103448	0.08000	0.066667	0.043478	0.138889	0.105263
9	0.072581	0.085106	0.08750	0.12000	0.105263	0.10000	0.12963	0.092105	0.088235	0.064286
10	0.078125	0.083333	0.085366	0.08000	0.095238	0.125000	0.117647	0.083333	0.076923	0.081081
11	0.146341	0.166667	0.277778	0.294118	0.111111	0.214286	0.148148	0.134615	0.146341	0.166667
12	0.108108	0.058824	0.091837	0.085714	0.069231	0.083333	0.081395	0.074074	0.083333	0.081395
13	0.07500	0.083333	0.04878	0.075758	0.080645	0.10000	0.086538	0.064103	0.075000	0.04878
14	0.057143	0.076923	0.083333	0.3000	0.25000	0.107143	0.10000	0.176471	0.178571	0.054545
15	0.071429	0.085714	0.047619	0.078947	0.10000	0.064516	0.142857	0.068966	0.111111	0.111111

Cuadro N° 14: Relación grosor de la capa músculo liso/diámetro arteriolar en pollos Cobb vantes de 10 días de edad criados a nivel del mar.

Arteriola N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.07500	0.111111	0.111111	0.090909	0.115385	0.142857	0.120000	0.117647	0.107143	0.100000
2	0.130435	0.12766	0.121951	0.133333	0.09434	0.108108	0.153846	0.089744	0.147541	0.117647
3	0.095238	0.100000	0.105263	0.142857	0.128205	0.111111	0.096774	0.083333	0.148148	0.128205
4	0.08000	0.105263	0.096774	0.115385	0.128205	0.121212	0.106383	0.10000	0.146341	0.121212
5	0.090909	0.125000	0.133333	0.10000	0.107143	0.15000	0.100000	0.086957	0.142857	0.166667
6	0.10000	0.142857	0.125000	0.111111	0.10000	0.088889	0.129032	0.136364	0.112676	0.100000
7	0.10000	0.092308	0.097561	0.10000	0.114286	0.138889	0.111111	0.142857	0.115385	0.090909
8	0.10000	0.105263	0.107143	0.128205	0.103448	0.153846	0.111111	0.090909	0.125000	0.130435
9	0.115385	0.128205	0.111111	0.09434	0.125000	0.120000	0.108108	0.111111	0.142857	0.114286
10	0.105263	0.100000	0.10000	0.121212	0.103448	0.108696	0.111111	0.09434	0.111111	0.125000
11	0.111111	0.103448	0.09434	0.125000	0.107143	0.116279	0.117647	0.114286	0.111111	0.120000
12	0.068966	0.116279	0.115385	0.109091	0.111111	0.111111	0.135135	0.130435	0.140000	0.083333
13	0.111111	0.100000	0.095238	0.142857	0.111111	0.102564	0.095238	0.121212	0.107143	0.119048
14	0.136364	0.125000	0.09375	0.10000	0.129032	0.115385	0.120000	0.128205	0.109589	0.103448
15	0.111111	0.085106	0.092593	0.103448	0.125000	0.133333	0.142857	0.111111	0.138889	0.148148

Cuadro N° 15: Relación grosor de la capa músculo liso/diámetro arteriolar en pollos Cobb vantes de 20 días de edad criados a nivel del mar.

Arteriola N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ave N°										
1	0.166667	0.151515	0.142857	0.153846	0.137931	0.150943	0.130435	0.142857	0.130435	0.114286
2	0.1000	0.09375	0.130435	0.097561	0.111111	0.125	0.125	0.102041	0.109589	0.111111
3	0.121212	0.130435	0.142857	0.137931	0.1250	0.129032	0.107143	0.133333	0.116667	0.139535
4	0.121212	0.1250	0.142857	0.136364	0.108108	0.108108	0.12963	0.1500	0.200	0.133333
5	0.111111	0.117647	0.111111	0.107143	0.1500	0.153846	0.142857	0.142857	0.148148	0.142857
6	0.130435	0.137255	0.137931	0.138889	0.142857	0.145833	0.1250	0.1600	0.111111	0.125
7	0.1500	0.111111	0.1250	0.115385	0.1200	0.128205	0.138889	0.094118	0.16129	0.109589
8	0.096774	0.111111	0.117647	0.132075	0.1250	0.129032	0.114286	0.115385	0.139535	0.16129
9	0.133333	0.135135	0.137931	0.115385	0.142857	0.105263	0.121212	0.125	0.114754	0.142857
10	0.136364	0.113636	0.145161	0.189189	0.137931	0.136364	0.142857	0.146341	0.117647	0.130435
11	0.1500	0.119048	0.107143	0.125	0.103448	0.117647	0.121212	0.100	0.1250	0.1500
12	0.09375	0.100	0.064516	0.083333	0.111111	0.133333	0.142857	0.090909	0.09434	0.153846
13	0.117647	0.162791	0.125	0.130435	0.121212	0.147059	0.129032	0.133333	0.153846	0.125
14	0.113636	0.115385	0.117647	0.142857	0.162162	0.134615	0.111111	0.166667	0.106061	0.111111
15	0.1600	0.1250	0.128205	0.086957	0.111111	0.138889	0.121951	0.131579	0.142857	0.136364

Cuadro N° 16: Relación grosor de la capa músculo liso/diámetro arteriolar en pollos Cobb vantes de 30 días de edad criados a nivel del mar.

Arteriola N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ave N°										
1	0.162791	0.1600	0.1500	0.166667	0.166667	0.200	0.1500	0.142857	0.133333	0.137931
2	0.136364	0.121622	0.153846	0.138889	0.166667	0.136364	0.162791	0.127273	0.148148	0.142857
3	0.111111	0.142857	0.136364	0.136364	0.139535	0.173913	0.166667	0.151515	0.147059	0.172414
4	0.085714	0.2500	0.111111	0.142857	0.1250	0.142857	0.1600	0.157895	0.162791	0.132075
5	0.100	0.132075	0.128205	0.12963	0.121212	0.184211	0.1500	0.1600	0.153846	0.135135
6	0.171429	0.1600	0.157895	0.153846	0.152174	0.128205	0.142857	0.153846	0.1500	0.166667
7	0.142857	0.105263	0.1600	0.121212	0.119048	0.096774	0.136364	0.200	0.1250	0.111111
8	0.117647	0.15625	0.148936	0.121212	0.136364	0.105263	0.1375	0.138889	0.166667	0.1500
9	0.086957	0.085714	0.133333	0.142857	0.1250	0.129032	0.155556	0.136364	0.121212	0.148148
10	0.15000	0.133333	0.083333	0.146341	0.153846	0.088235	0.1600	0.1250	0.130435	0.137931
11	0.1500	0.15625	0.1250	0.102564	0.157895	0.162791	0.148148	0.166667	0.129032	0.142857
12	0.157895	0.1375	0.1750	0.174603	0.148148	0.130435	0.129032	0.153846	0.166667	0.142857
13	0.138889	0.166667	0.1250	0.173913	0.157895	0.108696	0.148148	0.131579	0.153846	0.160714
14	0.1750	0.162791	0.171429	0.132075	0.208333	0.105263	0.12	0.130435	0.142857	0.142857
15	0.1250	0.146667	0.1250	0.093023	0.127273	0.134328	0.157143	0.133333	0.16129	0.136364

Cuadro N° 17: Relación grosor de la capa músculo liso/diámetro arteriolar en pollos Cobb vantes de 40 días de edad criados a nivel del mar.

Arteriola N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ave N°										
1	0.133333	0.125	0.166667	0.133333	0.142857	0.146341	0.135135	0.136364	0.173913	0.135135
2	0.151515	0.152542	0.129032	0.16	0.12500	0.166667	0.181818	0.111111	0.162162	0.131579
3	0.200	0.192308	0.133333	0.113636	0.1600	0.117647	0.153846	0.147059	0.142857	0.166667
4	0.166667	0.1500	0.1500	0.129032	0.1250	0.173913	0.1250	0.129032	0.134615	0.111111
5	0.138298	0.142857	0.181818	0.16129	0.1500	0.131579	0.181818	0.189189	0.157895	0.166667
6	0.092593	0.101266	0.115385	0.136364	0.139535	0.108434	0.133333	0.104167	0.1125	0.166667
7	0.100	0.102564	0.171429	0.186047	0.166667	0.166667	0.142857	0.166667	0.127273	0.178571
8	0.118421	0.145833	0.142857	0.176471	0.102041	0.142857	0.181818	0.138889	0.206897	0.148649
9	0.172414	0.200	0.166667	0.173913	0.121622	0.137931	0.142857	0.166667	0.166667	0.15625
10	0.170213	0.138462	0.137255	0.1500	0.163265	0.151515	0.181818	0.130435	0.142857	0.1500
11	0.153846	0.176471	0.142857	0.148148	0.181818	0.147059	0.122222	0.130435	0.142857	0.166667
12	0.173913	0.1500	0.141304	0.179487	0.116279	0.129032	0.153846	0.104167	0.157895	0.153846
13	0.200	0.192308	0.1500	0.1500	0.15625	0.166667	0.142857	0.155556	0.151515	0.096774
14	0.1600	0.111111	0.153846	0.119565	0.1500	0.184615	0.151515	0.111111	0.142857	0.173913
15	0.148148	0.1600	0.133333	0.147541	0.121212	0.178571	0.105263	0.136364	0.173913	0.111111

Cuadro N° 18: Relación grosor de la capa músculo liso/diámetro arteriolar en pollos Cobb vantes de 10 días de edad criados en altura (3320 ms.n.m.).

Arteriola N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.100	0.135135	0.066667	0.115385	0.100	0.128205	0.121951	0.111111	0.100	0.111111
2	0.142857	0.111111	0.115385	0.133333	0.107143	0.142857	0.100	0.117647	0.08	0.148936
3	0.107143	0.102041	0.160	0.133333	0.074074	0.103448	0.100	0.129032	0.155556	0.114286
4	0.142857	0.111111	0.087719	0.142857	0.09375	0.083333	0.133333	0.153846	0.098765	0.173913
5	0.1250	0.136364	0.108696	0.142857	0.1200	0.133333	0.137931	0.096154	0.100	0.136364
6	0.116279	0.103448	0.118644	0.125	0.086957	0.111111	0.081081	0.142857	0.148148	0.121212
7	0.102564	0.142857	0.1600	0.133333	0.100	0.090909	0.085106	0.166667	0.111111	0.125
8	0.133333	0.139535	0.108108	0.1	0.088235	0.111111	0.129032	0.133333	0.093023	0.115385
9	0.133333	0.125	0.0800	0.117647	0.133333	0.085714	0.108108	0.115385	0.131579	0.111111
10	0.1200	0.121212	0.115385	0.096774	0.116279	0.111111	0.111111	0.092105	0.115385	0.129032
11	0.066667	0.121951	0.111111	0.125	0.107143	0.166667	0.097561	0.103448	0.129032	0.083333
12	0.116667	0.115385	0.111111	0.111111	0.125	0.105263	0.117647	0.107692	0.108108	0.136364
13	0.105263	0.153846	0.115385	0.103448	0.088889	0.1	0.166667	0.074074	0.133333	0.100
14	0.1250	0.130435	0.1000	0.125	0.111111	0.117647	0.076923	0.085714	0.1000	0.153846
15	0.111111	0.117647	0.107143	0.114286	0.105263	0.123077	0.162791	0.142857	0.075472	0.1250

Cuadro N° 19: Relación grosor de la capa músculo liso/diámetro arteriolar en pollos Cobb vantes de 20 días de edad criados en altura (3320 ms.n.m.).

Arteriola N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ave N°										
1	0.142857	0.12069	0.133333	0.142857	0.137931	0.121212	0.142857	0.096774	0.140351	0.142857
2	0.139535	0.125	0.136364	0.111111	0.111111	0.128205	0.105263	0.148148	0.1200	0.129032
3	0.142857	0.138889	0.1500	0.117647	0.16129	0.100	0.111111	0.1600	0.133333	0.08
4	0.111111	0.133333	0.111111	0.4000	0.114286	0.108696	0.135135	0.1125	0.136364	0.142857
5	0.092593	0.142857	0.08046	0.132075	0.133333	0.1500	0.121212	0.142857	0.103448	0.100
6	0.107143	0.1500	0.127273	0.115385	0.12	0.142857	0.129032	0.114286	0.125	0.1500
7	0.114286	0.138889	0.1200	0.148936	0.114286	0.155172	0.111111	0.14	0.129032	0.1000
8	0.1200	0.108108	0.142857	0.142857	0.1200	0.1200	0.1250	0.125	0.111111	0.142857
9	0.117647	0.137931	0.115385	0.1000	0.111111	0.107143	0.152174	0.100	0.1000	0.171429
10	0.100	0.142857	0.100	0.148936	0.102564	0.111111	0.136364	0.1000	0.135135	0.121951
11	0.133333	0.175	0.153846	0.148148	0.125	0.133333	0.130435	0.166667	0.108108	0.133333
12	0.095238	0.119048	0.1200	0.096774	0.142857	0.113924	0.1400	0.138889	0.130435	0.1200
13	0.125	0.115385	0.111111	0.129032	0.103448	0.145161	0.085714	0.136364	0.157895	0.104167
14	0.142857	0.138889	0.156863	0.129032	0.136364	0.1000	0.133333	0.121212	0.129032	0.107143
15	0.10101	0.135135	0.111111	0.121212	0.103448	0.1250	0.129032	0.133333	0.119048	0.142857

Cuadro N° 20: Relación grosor de la capa músculo liso/diámetro arteriolar en pollos Cobb vantes de 30 días de edad criados en altura (3320 ms.n.m.).

Arteriola N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ave N°										
1	0.12069	0.15	0.121212	0.153846	0.114286	0.137255	0.135135	0.173913	0.166667	0.142857
2	0.125	0.125	0.153846	0.121212	0.128571	0.125	0.152941	0.138889	0.136364	0.133333
3	0.133333	0.125	0.148148	0.1200	0.1200	0.125	0.133333	0.153846	0.12	0.136364
4	0.157895	0.142857	0.1200	0.121212	0.130435	0.142857	0.166667	0.153846	0.136364	0.155556
5	0.136364	0.153846	0.146341	0.148148	0.125	0.153846	0.115385	0.157895	0.142857	0.12500
6	0.126582	0.153846	0.138889	0.146341	0.157895	0.136364	0.1200	0.117647	0.1500	0.1500
7	0.136364	0.166667	0.129032	0.172414	0.142857	0.138889	0.085106	0.100	0.103448	0.155556
8	0.152542	0.133333	0.1400	0.1500	0.1800	0.157895	0.136364	0.107143	0.133333	0.129032
9	0.116279	0.142857	0.15625	0.115385	0.1200	0.133333	0.12987	0.153846	0.1200	0.166667
10	0.159091	0.157895	0.173913	0.133333	0.148148	0.135593	0.139535	0.166667	0.142857	0.142857
11	0.166667	0.1600	0.146341	0.151515	0.121212	0.137255	0.133333	0.113636	0.16129	0.148148
12	0.133333	0.0800	0.111111	0.166667	0.116279	0.129032	0.119048	0.142857	0.150943	0.133333
13	0.136364	0.133333	0.137931	0.142857	0.138889	0.113636	0.109589	0.148936	0.1400	0.102564
14	0.15625	0.114286	0.121951	0.148148	0.129032	0.142857	0.1250	0.12500	0.138889	0.130435
15	0.108696	0.117647	0.103448	0.105263	0.148148	0.111111	0.175	0.15625	0.125	0.142857

Cuadro N° 21: Relación grosor de la capa músculo liso/diámetro arteriolar en pollos Cobb vantes de 40 días de edad criados en altura (3320 ms.n.m.).

Arteriola N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ave N°										
1	0.166667	0.166667	0.159091	0.166667	0.151515	0.123288	0.125	0.142857	0.16129	0.125
2	0.166667	0.1500	0.192308	0.170732	0.1500	0.185185	0.136364	0.176471	0.190476	0.150943
3	0.138889	0.136364	0.117647	0.123288	0.204545	0.121212	0.142857	0.145833	0.117647	0.136364
4	0.105263	0.150943	0.155556	0.136364	0.157895	0.115385	0.162791	0.171429	0.172414	0.138889
5	0.105263	0.116279	0.114286	0.157895	0.15	0.153846	0.125	0.129032	0.136364	0.192308
6	0.086957	0.107143	0.125	0.128205	0.208333	0.125	0.096154	0.145833	0.107143	0.159091
7	0.148148	0.1875	0.133333	0.172414	0.121212	0.108696	0.107143	0.126984	0.133333	0.173913
8	0.142857	0.130435	0.15625	0.194444	0.157895	0.1200	0.1200	0.166667	0.1200	0.104167
9	0.1200	0.157895	0.166667	0.130435	0.136364	0.147059	0.157895	0.1250	0.125	0.166667
10	0.139535	0.133333	0.181818	0.148148	0.129032	0.130435	0.177778	0.136364	0.166667	0.1250
11	0.139535	0.133333	0.181818	0.148148	0.129032	0.130435	0.177778	0.136364	0.166667	0.1250
12	0.15	0.129032	0.136364	0.1400	0.136364	0.125	0.135135	0.125	0.130435	0.166667
13	0.142857	0.1600	0.1200	0.184211	0.148148	0.139535	0.136364	0.148148	0.142857	0.151515
14	0.100	0.166667	0.2000	0.166667	0.142857	0.173913	0.16129	0.366667	0.162791	0.136364
15	0.130435	0.133333	0.150943	0.173913	0.1200	0.151515	0.140351	0.173913	0.2000	0.107143

