



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Asociación de polimorfismos de nucleótido simple de los genes endotelina 1, óxido nítrico sintasa endotelial y factor inducible por hipoxia 1 $\alpha$ , con síndrome de hipertensión pulmonar en pollos de engorde**

**Juana Soledad Moncaleano Vega**

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

**2011**



**Asociación de polimorfismos de nucleótido simple de los genes endotelina 1, óxido nítrico sintasa endotelial y factor inducible por hipoxia 1 $\alpha$ , con síndrome de hipertensión pulmonar en pollos de engorde**

**Juana Soledad Moncaleano Vega**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título

de:

Magister en Ciencias Producción Animal

Director

Ph.D. Fernando Ariza Botero

Línea de Investigación

Genética y Mejoramiento Animal

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia

Bogotá, Colombia

2011



*Dedicatoria*

*A mis padres:*

*Hugo Moncaleano y Leda Vega*



## **Agradecimientos**

A la DIB, por financiar el proyecto, al posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, por la refinanciación.

A mi Familia, a mi Papá y a mi Mamá por su sacrificio, pero también por su amor, su aplomo y sabiduría, a Sofia, Anita y a Rodri por devolverme el optimismo que en ocasiones me abandonó: a todos gracias por estar siempre conmigo, junto a mí.

A mis amigos y compañeros Ricardo Camacho, Natalia García, Iván Prieto, Marcela Ríos, Susan Castro, Maritza Sierra, Julian Ortiz, María Camila Bedoya y Fallon Riaño, por acompañarme en el largo camino recorrido durante este tiempo y su colaboración en la ejecución y feliz término del proyecto. A los Profesores Aureliano Hernández, Rodrigo Martínez, Marta Moreno de Sandino, Ligia Jiménez, Agustín Góngora, por sus sabios consejos y apoyo académico.

Y finalmente a mi tutor Fernando Ariza, por mantenerse como una pequeña luz cuando todo parecía ir mal.





## Resumen

El objetivo de este trabajo fue asociar polimorfismos de nucleótido simple (SNP) de los genes candidatos Endotelina 1 (*ET-1*), Óxido Nítrico Sintasa Endotelial (*eNOS*) y Factor Inducido por Hipoxia 1 Alfa (*HIF1 $\alpha$* ), con el síndrome de hipertensión pulmonar (SHP) en una población comercial de pollos de engorde sometida a hipoxia crónica y mapear el gen *eNOS*. Para los cuales se amplificaron *in vitro* microsátélites y segmentos intrónicos de los genes candidatos. Se emplearon geles de poliacrilamida denaturantes y no-denaturantes para visualizar los alelos. Los genotipos homocigotos y heterocigotos fueron secuenciados y analizados para identificar la naturaleza de los cambios. Para establecer asociación se usó el software Lamp-0.09 y para construir el mapa de ligamiento se empleo el programa MAPMAKER 3.0. Los resultados fueron ubicación del gen *eNOS* sobre brazo largo del cromosoma 2 (GGA2q) y asociación de SNP en los genes *eNOS* y *HIF1 $\alpha$*  con la susceptibilidad a desarrollar el síndrome de hipertensión pulmonar en grandes alturas. Se concluye que la susceptibilidad de los pollos de engorde está asociada con fallas en la regulación de la transcripción del gen *eNOS* y pos-transcripción del gen *HIF1 $\alpha$* , debidas a polimorfismos hallados en elementos de regulación *cis* y *trans* activación que interfieren con los niveles de expresión de los genes relacionados, además de estimar la ubicación cromosómica del gen *eNOS* por ligamiento genético con el gen *ET-1* y 4 microsátélites al GGA2q, que lo enmarca dentro de una región cromosómica asociada con el SHP.

**Palabras claves:** Hipertensión pulmonar, SNP, regulación de la transcripción, elementos *cis* y *trans*-activación

## Abstract

The aim of this study was associated to the single nucleotide polymorphisms (SNPs) in candidate genes Endothelin 1 (*ET-1*), endothelial nitric oxide synthase (*eNOS*) and hypoxia-inducible factor 1 alpha (*HIF1 $\alpha$* ), with pulmonary hypertension syndrome (PHS) in commercial population of broiler chickens subjected to chronic hypoxia and *eNOS* gene mapping. The microsatellites and introns segments of candidate genes were amplified in vitro. Non-denaturantes and denaturantes Polyacrylamide gels have been used for allelic reading. Homozygous and heterozygous genotypes were sequenced and analyzed to identify the nature's change. To establish this association we used Lamp-0.09 software and MAPMAKER 3.0. software to build the linkage map. The results were the location of the *eNOS* gene over chromosome 2 long arm (GGA2q). The *eNOS* gene SNPs and *HIF1 $\alpha$*  gene SPNs were associated with susceptibility to develop PHS at high altitudes. We conclude that susceptibility of broiler chickens to PHS is associated with failures in *eNOS* gene transcription regulation and even to failures with post-transcription *HIF1 $\alpha$* , due to polymorphisms found in regulatory elements- *cis* and activation- *trans*, cause interferences with the expression levels of the related genes. In addition to estimate the chromosomal location of the *eNOS* gene by genetic linkage with the gene *ET-1* and 4 microsatellites to GGA2q, which lay within a HPS associated chromosomal region.

**Key Words:** Pulmonary hypertension, SNP, elements- *cis* and activation-*trans*, transcription regulation

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen .....</b>	<b>IX</b>
<b>Lista de figuras .....</b>	<b>XIII</b>
<b>Lista de tablas .....</b>	<b>XV</b>
<b>Lista de Símbolos y abreviaturas .....</b>	<b>XVI</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Capítulo 1 El síndrome de hipertensión pulmonar ¿un origen genético en pollos de engorde?.....</b>	<b>5</b>
1.1 Introducción.....	5
1.2 El genoma del pollo.....	6
1.2.1 Variaciones genéticas .....	9
1.3 ¿Un origen genético en el pollo de engorde? .....	12
1.3.1 Genes candidatos.....	17
1.3.2 Señal de regulación de la expresión de los genes candidatos en hipoxia.....	20
1.4 Referencias .....	24
<b>2. Capítulo 2 Asignación de los genes <i>ET-1</i> y <i>NOS3</i> por ligamiento genético al cromosoma 2 del pollo doméstico .....</b>	<b>35</b>
2.1 Introducción.....	35
2.2 Materiales y Métodos.....	37
2.2.1 Población de estudio .....	37
2.2.2 Sacrificio y Toma de Muestra.....	38
2.2.3 Extracción de ADN genómico .....	38
2.2.4 Diseño de iniciadores .....	39
2.2.5 Amplificación.....	40
2.2.6 Condición de los geles y Visualización de los alelos.....	40
2.2.7 Revelado de los Geles .....	42
2.2.8 Lectura de genotipos.....	42
2.2.9 Construcción del mapa de ligamiento genético .....	42
Resultados.....	43
2.3 Discusión .....	46
2.4 Referencias .....	48
<b>3. Capítulo 3 Asociación de polimorfismos de los genes <i>ET-1</i>, <i>NOS3</i> y <i>HIF1<math>\alpha</math></i> con la susceptibilidad de los pollos de engorde a desarrollar el síndrome de hipertensión pulmonar en grandes alturas .....</b>	<b>53</b>
3.1 Introducción.....	53
3.1.1 <i>ET-1</i> .....	53
3.1.2 <i>NOS3</i> .....	54
3.1.3 <i>HIF1<math>\alpha</math></i> .....	55
3.2 Materiales y métodos.....	56
3.2.1 Población de estudio .....	56
3.2.2 Sacrificio y toma de muestras .....	57

3.2.3	Determinación del Índice cardiaco .....	58
3.2.4	Extracción de ADN genómico .....	58
3.2.5	Diseño de iniciadores .....	58
3.2.6	Amplificación.....	60
3.2.7	Detección de los SNPs.....	60
3.2.8	Revelado de los geles y lectura de genotipos .....	61
3.2.9	Análisis estadístico .....	61
3.2.10	Secuenciamiento .....	62
3.3	Resultados.....	63
3.3.1	Índice cardiaco.....	63
3.3.2	Análisis de asociación genética .....	63
3.3.3	Análisis de secuencias .....	66
▪	<i>NOS3</i> .....	67
▪	<i>HIF1<math>\alpha</math></i> .....	68
3.4	DISCUSIÓN .....	69
3.5	Referencias .....	73
<b>4.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>81</b>
4.1	Conclusiones.....	81
4.2	Recomendaciones .....	84

## Lista de figuras

	<b>Pág.</b>
FIGURA 1-1. SEÑAL DE REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN EN EL NÚCLEO DE CÉLULAS ENDOTELIALES. ESTABILIZACIÓN DEL FACTOR HIF1A EN CONDICIONES DE HIPOXIA Y SU UNIÓN A HRE, QUE ACTIVA LA TRANSCRIPCIÓN POR LA ACCIÓN DE UN MEDIADOR. ADAPTADO DE WENGER, 2000; ORPHANIDES Y REINBERG, 2002, SEMENZA, 2004; MAZURE <i>ET AL.</i> , 2004 Y KALUZ <i>ET AL.</i> , 2008). .....	21
FIGURA 2-1. SÍNTESIS DE ENDOTELINA 1 Y NOS3 EN LA CÉLULA ENDOTELIAL. RESUMEN DE LA SEÑAL DE TRANSCRIPCIÓN DE LOS GENES <i>ET-1</i> Y <i>NOS3</i> MODULADA POR HIF1A EN CONDICIONES DE HIPOXIA PARA GENERAR VASOCONSTRICCIÓN Y VASODILATACIÓN. ....	23
FIGURA 3-2. ESQUEMA MAPA DE LIGAMIENTO SOBRE GGA2Q. SE RESALTA LA UBICACIÓN DE LOS GENES <i>NOS3</i> Y <i>ET1</i> . $\theta$ : 24% $LOD > 6,44$ . LOS MICROSATÉLITES SON REPORTADOS POR RABIE (2004). LONGITUD TOTAL DEL MAPA 165.9 CM. ....	44
FIGURA 4-2. ESQUEMAS DE MAPAS DE LIGAMIENTO SOBRE EL GGA2Q. ....	45
FIGURA 5-2. LOCALIZACIÓN ORTÓLOGA DE LOS GENES <i>NOS3</i> Y <i>ET1</i> EN HUMANOS (HSA), RATONES (MM) Y BOVINOS (BTA). .....	46
FIGURA 6-3. POSICIÓN DE LOS INICIADORES EN EL INTRÓN 3 DEL GEN <i>ET1</i> . ....	59
FIGURA 7-3. POSICIÓN DE LOS INICIADORES ENTRE LOS EXONES 1 Y 2 DEL GEN <i>NOS3</i> . ....	59
FIGURA 8-3. POSICIÓN DE LOS INICIADORES EN EL INTRON 6 DEL GEN <i>HIF1A</i> . ....	59
FIGURA 9-3 ARCHIVO DE ENTRADA LAMP-0.09. ....	64
FIGURA 10-3. ESTRUCTURA DEL GEN <i>ET-1</i> . ....	66
FIGURA 11-3. ESTRUCTURA DEL GEN <i>NOS3</i> . ....	67
FIGURA 12-3. ESTRUCTURA DEL GEN <i>HIF1A</i> . ....	68

XIV Asociación de polimorfismos de nucleótido simple de los genes endotelina 1, óxido nítrico sintasa endotelial y factor inducible por hipoxia 1 $\alpha$ , con síndrome de hipertensión pulmonar en pollos de engorde

---

# Lista de tablas

	<b>Pág.</b>
TABLA 1-1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS MACRO- Y MICROCROMOSOMAS .....	8
TABLA 2-1. FRECUENCIA DE SNPs EN RED JUNGLE FOWL COMPARADA CON TRES LÍNEAS DE POLLOS DOMÉSTICOS. ....	11
TABLA 3-2. SECUENCIA DE LOS INICIADORES UTILIZADOS EN EL ANÁLISIS DE LOS SEGMENTOS DE LOS GENES <i>ET1</i> Y <i>NOS3</i> .....	39
TABLA 4-2. CARACTERÍSTICAS DE LOS MICROSATÉLITES UTILIZADOS PARA LA CONSTRUCCIÓN DEL MAPA DE LIGAMIENTO GENÉTICO. .....	40
TABLA 5-2 PROTOCO DE AMPLIFICACIÓN DE GENES Y MICROSATÉLITES. ....	41
TABLA 6-2. CONDICIONES DENATURANTES Y NO-DENATURANTES DE GELES DE POLIACRILAMIDA.....	41
TABLA 7-2. GENOTIPOS DE LOS MARCADORES PARA LA CONSTRUCCIÓN DEL MAPA DE LIGAMIENTO.....	43
TABLA 8-2. ANÁLISIS DE 2 PUNTOS ENTRE MARCADORES 1 Y 2.....	44
TABLA 9-3. DETALLE DE LAS CARACTERÍSTICAS DE AMPLIFICACIÓN.....	60
TABLA 10-3. CONDICIONES DE LOS GELES NO DENATURANTES PARA TÉCNICA SSCP .....	61
TABLA 11-3. FRECUENCIA DE AVES SANAS Y ENFERMAS .....	63
TABLA 12-3 PRUEBA DE ASOCIACIÓN GENÉTICA PARA LOS GENES <i>ET-1</i> Y <i>NOS3</i> .....	65
TABLA 13-3 PRUEBA DE ASOCIACIÓN GENÉTICA PARA EL GEN <i>HIF1A</i> .....	65
TABLA 14-3. POLIMORFISMOS IDENTIFICADOS EN EL INTRÓN 3 DEL GEN <i>ET-1</i> .....	66
TABLA 15-3. FRECUENCIA ALÉLICA PARA EL GEN <i>ET-1</i> EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO .....	66
TABLA 16-3. POLIMORFISMOS IDENTIFICADOS EN EL INTRÓN 1 DEL GEN <i>NOS3</i> .....	67
TABLA 17-3. POLIMORFISMOS EN LA SECUENCIA AMPLIFICADA A PARTIR DEL INTRÓN 1 DEL GEN <i>NOS3</i> .....	68
TABLA 18-3. POLIMORFISMOS IDENTIFICADOS EN EL INTRÓN 6 DEL GEN <i>HIF1A</i> .....	68
TABLA 19-3. FRECUENCIA DE LOS ALELOS DEL GEN <i>HIF1A</i> EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO .....	69
TABLA 20-3 CONSENSO GENOTIPOS-SECUENCIAS-ÍNDICES CARDIACOS .....	69

# Lista de Símbolos y abreviaturas

## Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Definición
<b>A</b>	Alfa	HIF1 $\alpha$
<b>B</b>	Beta	HIF1 $\beta$

## Abreviaturas

Símbolo	Término
<i>SHP</i>	Síndrome de Hipertensión Pulmonar
<i>ET-1</i>	Endotelina -1
<i>NOS3</i>	Óxido Nítrico Síntasa tres
<i>HIF1<math>\alpha</math></i>	Factor Inducido por Hipoxia 1 alfa
<i>eNOS</i>	Óxido Nítrico Síntasa Endotelial
<i>SNP</i>	Polimorfismo de Nucleótido Simple
<i>ADN</i>	Ácido Desoxirribonucleico
<i>BAC</i>	Cromosoma artificial Bacteriano
<i>cDNA</i>	Ácido Desoxirribonucleico complementario
<i>LINES</i>	Elementos dispersos largos



---

<b>Símbolo</b>	<b>Término</b>
<i>CTFG</i>	Gen Factor de crecimiento de tejido conectivo
<i>EPO</i>	Gen Eritropoyetina
<i>DMT1</i>	Gen transportador de metales bi-valentes-1
<i>cM</i>	centiMorgas
<i>CMH</i>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
<i>SINEs</i>	Elementos Cortos Dispersos
<i>MCS</i>	Secuencias Conservadas Multiespecies
<i>EST</i>	Etiquetas de Secuencias expresadas
<i>SSCP</i>	Polimorfismos Conformacional de Cadena sencilla
<i>PCR</i>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<i>QTL</i>	Loci de Rasgos Cuantitativos
<i>Hb</i>	Hemoglobina
<i>HRE</i>	Elementos de respuesta a la hipoxia
<i>RNAm</i>	Ácido Ribonucleico mensajero
<i>G/T</i>	Cambio de Guanina a Timina
<i>Lys</i>	Lisina
<i>Asp</i>	Ácido Aspartico
<i>ON</i>	Óxido Nítrico
<i>VNTRs</i>	Número Variable de repeticiones en Grupo
<i>pb</i>	Pares de Bases
<i>bHLH</i>	Hélice-Lazo-Hélice-básica
<i>PAS</i>	PER-ARNT-SIM
<i>ODDD</i>	Dominios de Degradación Dependientes de Oxígeno
<i>PPET</i>	Preproendotelina
<i>ECE</i>	Enzima Convertidora de Endotelina

XVIII Asociación de polimorfismos de nucleótido simple de los genes endotelina 1, óxido nítrico sintasa endotelial y factor inducible por hipoxia 1 $\alpha$ , con síndrome de hipertensión pulmonar en pollos de engorde

---

<b>Símbolo</b>	<b>Término</b>
----------------	----------------

---

<i>Trp</i>	Triptófano
------------	------------

<i>Val</i>	Valina
------------	--------

# Introducción

Las enfermedades de origen genético, pueden ser ocasionadas por el cambio de solo un nucleótido y este puede estar en secuencias reguladoras de la expresión o en los exones (mutaciones no sinónimas), incluso en los lugares claves para realizar los cortes y empalmes alternativos dentro de los intrones. La información codificada es tan crítica que ese único cambio, puede ser suficiente para desencadenar patologías y hacer a los individuos más o menos susceptibles a desarrollar enfermedades crónicas. Hace un par de décadas atrás, se creía que la regulación de los genes, se procuraba desde secuencias en regiones intergénicas (potenciadores o silenciadores) y secuencias ubicadas en las regiones 5'UTR y 3'UTR. Pero desde la década de los 90, el concepto de basura evolutiva, que hace referencia a secuencias altamente repetitivas y a los intrones, empezó a cambiar. A partir de los intrones pueden surgir secuencias de RNA que regulan la traducción de un RNA mensajero, permitiendo su acople con el ribosoma o su degradación temprana en el citoplasma. Los mecanismos aun están en estudio, las señales que llevan a los intrones a transcribir pequeñas moléculas de RNA y a seleccionar transcritos primarios o maduros, aun están por descubrirse. Pero el concepto general de resistencia o susceptibilidad genética, se basa en la búsqueda de esos polimorfismos que confieren estas características de adaptación o condición deletérea. Por ejemplo en el genoma del pollo doméstico, existen más de 3 millones de SNPs, dispersos por todo el genoma, algunos ya están asociados con alelos de susceptibilidad o resistencia a Marek, Coccidiosis, Salmonella y a características productivas como deposición de grasa y crecimiento muscular. Pero las variaciones que estén alterando un proceso biológico o actividad celular, sirven para nominar genes candidatos. Para la identificación de estas variaciones existen métodos estandarizados que se

pueden emplear si se conoce el SNP o si se empieza una búsqueda a ciegas. Los programas de análisis de secuencias y los de diseño estadístico, también están a la orden del día y en muchas ocasiones estas herramientas bioinformáticas se pueden descargar de forma gratuita de la web o trabajar en línea. Una de las utilidades de este tipo de estudios, es la identificación de animales resistentes a enfermedades mediante un programa conocido como selección asistida por marcadores, pero tradicionalmente los productores y genetistas aviares, se han concentrado en mejorar caracteres de producción y muy pocos se dedican a generar información acerca de polimorfismos genéticos asociados con resistencia. En este contexto, en investigaciones previas se ha encontrado que el aumento en la mortalidad y morbilidad al síndrome de hipertensión pulmonar (SHP), está sujeto a fallas en la adaptación de pollos mejorados genéticamente a grandes alturas. Este síndrome se origina a partir de la vasoconstricción sostenida del sistema arterial pulmonar ocasionado por la exposición a la hipoxia natural crónica y a bajas temperaturas. En estudios pioneros se ha encontrado que los bajos niveles de RNAm del gene *NOS3* y *HIF1 $\alpha$*  hallados en los pulmones de pollos de engorde enfermos, estarían asociados con la susceptibilidad a desarrollar el síndrome en grandes alturas. Uno de los objetivos de este trabajo fue identificar polimorfismos funcionales en secuencias intrónicas de los genes candidatos *ET-1*, *eNOS* y *HIF1 $\alpha$* , con el fin de asociarlos a la enfermedad y fundamentar un origen genético del origen de la enfermedad en pollos de engorde en una línea comercial, mediante el diseño de casos-contróles con individuos no relacionados. En la metodología se emplearon geles de poliacrilamida denaturantes y no-denaturantes para la búsqueda de los polimorfismos. Los genotipos homocigotos y heterocigotos fueron secuenciados y analizados para identificar la naturaleza de los cambios. Para establecer asociación se usó el software Lamp-0.09 y para la construcción de un mapa de ligamiento genético con el fin de mapear el gen *NOS3* en el cromosoma 2, se empleó el programa MAPMAKER 3.0. Los resultados fueron ubicación del gen *eNOS* sobre brazo largo del cromosoma 2 (GGA2q) y asociación de SNPs en los genes *eNOS* y *HIF1 $\alpha$*  con la susceptibilidad a desarrollar el síndrome de hipertensión pulmonar

en grandes alturas. Entre las conclusiones del trabajo se destaca que: la susceptibilidad al SHP de los pollos de engorde, está asociada con fallas en la regulación de la transcripción del gen *eNOS* y pos-transcripción del gen *HIF1 $\alpha$* , debidas a polimorfismos hallados en elementos de regulación *cis* y *trans* activación que interfieren con los niveles de expresión de los genes relacionados; y que la ubicación cromosómica del gen *eNOS* por ligamiento genético con el gen *ET-1* y 4 microsatélites al GGA2q, lo enmarca dentro de una región cromosómica asociada con el SHP.



# 1. Capítulo 1 El síndrome de hipertensión pulmonar ¿un origen genético en pollos de engorde?

## 1.1 Introducción

El síndrome de hipertensión pulmonar (SHP) ha sido atribuido a una insuficiente capacidad vascular pulmonar (Wang *et al.*, 2002; Rabie *et al.*, 2005) y a un limitado desarrollo cardíaco de las estirpes de rápido crecimiento (Olkowski, 2007). Sin embargo, estudios de fisiopatología (Burton y Smith, 1967; Pan *et al.*, 2005; Cueva *et al.*, 1974; Hernández, 1982; Moreno de Sandino, 2004) y de expresión de RNA mensajero en el endotelio vascular pulmonar en pollos hipertensos y sanos de los genes Endotelina uno (*ET1*) (Gomez *et al.*, 2007), Óxido nítrico sintasa tres (*NOS3*) (Gómez, 2008) y del Factor inducido por hipoxia 1 alfa (*HIF1 $\alpha$* ) (Areiza, 2010), sugieren que existe un factor genético asociado con la susceptibilidad a desarrollar el SHP en condiciones de hipoxia hipobárica crónica o a bajas temperaturas.

La enfermedad en los pollos, al igual que en humanos y otros mamíferos, es de características complejas y se considera que junto a los genes que codifican para las proteínas ET1, NOS3 o óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y el factor de transcripción HIF1 $\alpha$ , existe a un grupo adicional de ellos que podrían ser responsables de la presentación del síndrome (Rabie, 2004; Gómez *et al.*, 2007; Druyan *et al.*, 2007). Para Range *et al.*, (2002) y Druyan *et al.*, (2007), el aumento en la morbilidad y mortalidad en la producción avícola, se atribuye a la selección de nuevas variantes genéticas por mutación, con las que se logra mejorar el tamaño de la carcasa y la masa muscular magra, pero se reduce el tamaño de

órganos de mantenimiento como el corazón y los pulmones. Sin embargo, en un trabajo reciente, no se halló asociación entre la relación peso pulmonar: peso corporal con la susceptibilidad a desarrollar el SHP de origen hipóxico en una estirpe moderna de pollos de engorde (Vásquez, 2010).

Un paso importante en la identificación de un posible origen genético de la enfermedad, es realizar estudios de asociación genética, donde se busque establecer una relación estadística entre las variaciones de los genes candidatos en los pollos con SHP y los sanos (diseño casos-contrroles). Las variaciones más comunes del genoma son los polimorfismos de nucleótido simple (*SNP: Single Nucleotide Polymorphism*) y su abundancia permite realizar estudios de funcionalidad y evolución o sencillamente sirven para caracterizar genotipos entre líneas comerciales (Jurinke *et al.*, 2005). Aunque su hallazgo en exones, promotores o secuencias reguladoras de la expresión intrínsecas en los intrones, podría implicar cambios en el fenotipo asociados con enfermedad (Pagani y Baralle, 2004). El *Gallus gallus* es un importante modelo biológico y como consecuencia, luego de la secuenciación del genoma, la inquietud al igual que en los humanos, fue realizar un mapa de variaciones genéticas que se asociaran con cambios funcionales y se pudieran llevar a cabo comparaciones entre especies. El objetivo de la presente revisión es describir los métodos empleados en la secuenciación del genoma del pollo doméstico (*Gallus gallus domesticus*), ilustrar algunas técnicas empleadas en la identificación de polimorfismos en el genoma, además de nominar los genes candidatos para explicar la susceptibilidad genética de los pollos de engorde a desarrollar el SHP a grandes alturas.

## 1.2 El genoma del pollo

La primera secuencia borrador del genoma del pollo se llevó a cabo a partir de una hembra de la línea Red Jungle Fowl (*Gallus gallus gallus*, ZW) ancestro del



pollo doméstico, empleando la estrategia whole-genome shotgun con una cobertura de 6,6x. Esta metodología produjo una secuencia de alta calidad, que se atribuye al tamaño del genoma:  $1,2 \times 10^9$  pb (Schmid *et al.*, 2000; Groenen *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2003; Emara y Kim, 2003) y al bajo contenido de DNA repetitivo: 11%, comparado con los genomas mamíferos (~50%) (Dequéant y Pourquié, 2005; Burt, 2005; Burt *et al.*, 2007).

El ensamble del genoma fue el resultado del alineamiento de secuencias contiguas de una genoteca BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*), generadas en el Centro de Secuenciación de Genomas de la Universidad de Washington, a partir de productos de digestión del mismo genoma (Dequéant y Pourquié, 2005). Al menos 100,000 contigs fueron ensamblados dentro de genotecas genómicas de 907 Mb. Es de anotar que hace falta mucha información sobre los cromosomas sexuales en el ensamble final debido al contenido de material altamente repetitivo, mientras que los autosomas han mostrado una cobertura del 98% por alineación de secuencias de clones BAC de alta calidad. Esta sobreposición de clones de cDNA, sugiere que entre un 5% y un 10% de los genes no se encuentran en el ensamble final por la presencia de genes duplicados y regiones ricas en GC, convirtiéndose este factor en una gran limitante para el sistema de ensamble (Burt, 2005), evidente en el cromosoma W y el cromosoma 16 donde se encuentra la región del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) (Carre *et al.*, 2006). Aunque el ensamble también muestra que el %GC, la concentración de islas CpG y densidad de genes es 1,6 veces superior en los microcromosomas que en los macrocromosomas (Schmid *et al.*, 2000; Carre *et al.*, 2006; Megens *et al.*, 2009), con una mayor tasa de recombinación en los microcromosomas (Burt, 2005; Megens *et al.*, 2009) Tabla 1-1.

**Tabla 1-1. Características generales de los macro- y microcromosomas**

Rasgo	Macrochromosoma	Microchromosoma
Densidad genética (por Mb)	9.0 a 15.4	13.8 a 41.2
Longitud de intrones (pb)	4066 a 5742	1867 a 4128
Longitud de exones (pb)	164 a 171	157 a 172
Longitud intergénica (kb)	18 a 31	8 a 24
Contenido de G+C (%)	38.4 a 40.1	40.9 a 50.1
Densidad de islas CpG (por Mb)	29 a 49	73 a 266
LINES (%)	6.0 a 11.9	2.5 a 10.0
Tasa de recombinación (cM/Mb)	2.5 a 3.2	2.5 a 17.1

Mb: megabase; pb: pares de bases; kb: kilobase; cM: centiMorgan. Adaptado de Burt, 2005.

El primer acercamiento para identificar elementos funcionales del genoma se basó en la comparación de secuencias ortólogas, asumiendo que estas conservan su función a través de millones de años de evolución (Brown *et al.*, 2003). Empleando métodos computacionales se compararon estas secuencias a intervalos de 1,8 Mb a partir del cromosoma humano 7q31 y con fragmentos de cromosomas de 27 mamíferos y no mamíferos, incluido el pollo. El 5% de las secuencias se conservó entre las múltiples especies (*MCSs: multi-species conserved sequences*), de las cuales el 22% de las MCSs se encuentra en las secuencias codificadoras, pero el 72% no posee función conocida. Comparaciones preliminares de los genomas del pollo y el humano demuestran que el ~4-5% (el 70% de los exones) de las secuencias humanas se alinean con las del pollo, pero sólo el 40% de las regiones reguladoras conocidas se encuentran alineadas (Dequéant y Pourquié, 2005). La comparación de los mapas genéticos sugiere una conservación de sintenia, posiblemente mayor a la encontrada entre el ratón y el humano (Brown *et al.*, 2003; Emará y Kim, 2003),

pero con la falta de elementos SINEs (*Short interspersed elements*): secuencias repetidas dispersas en el genoma de función desconocida (Burton, 2005).

La página web *Ensembl* incluye el primer informe de predicción de genes y proteínas, que se basó en el alineamiento de etiquetas de secuencias expresadas (*EST: expressed sequence tag*) del pollo y de mamíferos, en el que se emplearon los programas GeneScan, ab initio, TWINSKAN, y SPG-2 ([http://www.ensembl.org/Gallus\\_gallus/](http://www.ensembl.org/Gallus_gallus/)), los resultados fueron: 17.707 genes con 28.491 transcritos de los cuales el 30% se deben a cortes y empalmes alternativos, además de 11.030 genes ortólogos con genes humanos (Dequéant y Pourquié, 2005; Burt, 2005). Otras bases de datos que contiene información sobre las metodologías empleadas en la predicción de genes y proteínas del *Gallus gallus* son: <http://www.tigr.org/tdb/tgi/gggi/>; <http://cogburn.dbi.udel.edu/>; [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST\\_summary.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html) (Emara y Kim, 2003; Carre *et al.*, 2006).

Otra característica del genoma de las aves es la gran variabilidad en el tamaño de los cromosomas. El genoma del pollo está dividido en 78 cromosomas: 16 macrocromosomas, incluido el par sexual Z y W, y 62 microcromosomas (Schmid *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2003). Cada brazo tiene al menos un punto obligado de entrecruzamiento, pero los microcromosomas tienen una tasa mayor de recombinación: 6,4 cM/Mb, comparada con la tasa en los macrocromosomas: 2,8 cM/Mb, incluso mayor a la de los humanos: 1-2 cM/Mb. Esto hace del pollo un organismo ideal para estudios de ligamiento genético (*International Chicken Polymorphism Map Consortium*, 2004; Burt, 2005).

### 1.2.1 Variaciones genéticas

En paralelo con el proyecto de secuenciación del genoma, se construyó un mapa de variaciones genéticas que contiene 2.833.578 SNPs identificados en tres líneas comerciales de pollos domésticos (pollo para asadero, gallina ponedora y

gallina de plumaje sedoso) y su ancestro común (Carre *et al.*, 2006). Los experimentos indican que al menos el 90% de los sitios variantes son SNPs verdaderos y el 70% son comunes por segregación entre líneas comerciales y el ancestro. Una segunda oportunidad de secuenciación confirmó el 94% de los SNPs, de los cuales el 83% son no sinónimos (Burt, 2005; Burt *et al.*, 2007). La comparación entre las lecturas de las secuencias de los pollos para asadero, las gallinas ponedoras y las gallinas de plumaje sedoso con *Red Jungle Fowl* (RJF), reveló cerca de un millón de SNPs en cada línea. La tasa fue de 5 SNPs por kb, que se calculó como diversidad de nucleótidos ( $\pi$ ) y se expresó en unidades de  $\pi \times 10^3$  (tabla 2-1). La tasa de inserciones, deleciones y SNPs fue independiente del tamaño de los cromosomas y de la tasa de recombinación (*International Chicken Polymorphism Map Consortium*, 2004). El mapa genético realizado con las variaciones genéticas halladas en las tres líneas domésticas se puede encontrar en la página web <http://chicken.genomics.org.cn/index.jsp> (Carre *et al.*, 2006).

Para el año 2006, el empleo de nuevas herramientas para la identificación de SNPs aumentó el número de polimorfismos en los genomas de las 3 líneas comerciales al ser comparadas con el ancestro común. Entre las herramientas utilizadas para la identificación rápida y la estimación de las frecuencias alélicas están: 1. La espectrometría que estima la frecuencia de los alelos basada en la intensidad relativa de la banda del alelo en el gel, 2. El polimorfismo de conformación de cadena sencilla (SSCP: *Single Strand Conformation Polymorphism*) basado en el principio de que la conformación del ADN es alterada por un cambio en un nucleótido y su nueva conformación puede ser detectada como un cambio de movilidad en un gel de electroforesis, 3. La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) en tiempo real que requiere un conocimiento previo del SNP, el diseño de iniciadores específicos fluoromarcados y el monitoreo de la señal de fluorescencia durante la amplificación con el fin de detectar y cuantificar el alelo de interés, y 4. La pirosecuenciación, que emplea una reacción que combina cuatro enzimas para determinar la frecuencia en tiempo real por

liberación de pirofosfatasa del SNP durante la amplificación. Para este método también es necesario conocer la existencia del SNP (Ye *et al.*, 2006).

**Tabla 2-1. Frecuencia de SNPs en Red Jungle Fowl comparada con tres líneas de pollos domésticos.**

Comparación	Número de SNPs	L (efectividad)	SNPs kb <sup>-1</sup>
Ancestro vs domésticos			
RJF-broiler	1,041,948	197,431,517	5.28
RJF-layer	889,377	170,586,544	5.21
RF-silkie	1,217,817	217,841,171	5.59
Entre líneas domésticas			
Broiler-layer	194,605	37,506,800	5.19
Broiler-silkie	257,849	47,554,311	5.42
Layer-silkie	246,954	42,682,304	5.79
Dentro de líneas domésticas			
Broiler-broiler	59,227	13,835,075	4.28
Layer-layer	40,412	10,863,595	3.72
Silkie-silkie	83,630	15,253,383	5.48

Adaptado de *International Chicken Polymorphism Map Consortium*, 2004.

Hoy, la base de datos chickVD tiene un inventario de 3.624.831 sitios variantes (<http://chicken.genomics.org.cn/index.jsp>). La segregación común de SNPs entre líneas provee información sobre un gran número de genes candidatos en loci de características cuantitativas (*QTL: quantitative trait loci*) que controlan rasgos económicos en los pollos de engorde. Los mapas de QTL incluyen 1200 loci, con ~200 características de importancia económica como crecimiento, tamaño de la canal, peso corporal, conversión de alimento, deposición de grasa y unos 400

genes, entre ellos genes de susceptibilidad a la enfermedad de Marek (Lipkin *et al.*, 2002; Burt *et al.*, 2007), salmonella, coccidiosis (Emara y Kim, 2003) y al síndrome de hipertensión pulmonar (Rabie, 2004; Rabie *et al.*, 2005).

Entre otras tecnologías disponibles para la búsqueda y la identificación de variaciones tipo SNP, término que también incluye deleciones e inserciones (Cantor, 2005; Jurinke *et al.*, 2005; Sauer *et al.*, 2002; Sauer, 2006) están: Kaspar, tecnología Taqman, tecnología MassARRAY de SEQUENOM, tecnología SNPlex de Applied Biosystems y tecnología VeraCode de Illuminas. Todas son sistemas de genotipificado por fluorescencia capaces de discriminar mediante PCR múltiple, los alelos de un SNP en un locus específico a partir de ADN genómico ([www.cegen.com](http://www.cegen.com)).

### **1.3 ¿Un origen genético en el pollo de engorde?**

La presión barométrica disminuye a medida que aumenta la altura sobre el nivel del mar y de forma análoga, la presión parcial de oxígeno en el aire inspirado por los animales es menor. Los mecanismos fisiológicos compensatorios conocidos incluyen: A) la hiperventilación, a partir de la detección de las variaciones en las presiones parciales sanguíneas de oxígeno, anhídrido carbónico y pH en los receptores periféricos (glomero carotídeo y aórtico). B) el aumento del contenido de la hemoglobina de los glóbulos rojos y de los valores del hematocrito, por liberación renal de eritropoyetina en respuesta a la hipoxemia. C) el aumento de la presión arterial pulmonar, para incrementar el flujo sanguíneo en el pulmón hacia áreas menos ventiladas del órgano. Este último mecanismo, en animales con predisposición genética, resulta en el SHP. Investigaciones realizadas en pollos comerciales vs pollos criollos, en los que se midieron variaciones cardiopulmonares, valores de hemoglobina (Hb) y hematocrito en ambientes de hipoxia natural, los pollos nativos no presentaron susceptibilidad a desarrollar hipertensión pulmonar, como sí se presenta en la línea comercial (Moreno de Sandino y Hernández, 1985), lo que sugeriría que las estirpes sometidas a selección y mejoramiento genético serían presumiblemente más susceptibles a

desarrollar el SHP (Pulido, 1996; Olkowski, 2007). Zhang *et al.*, (2007) explican que los pollos y mamíferos nativos de tierras altas poseen genotipos adaptados a grandes alturas, que fisiológicamente se caracterizan por alta afinidad Hb-oxígeno, una respuesta moderada o nula a la policitemia, una baja presión parcial de oxígeno y una delgada pared vascular del árbol pulmonar, que se mantienen aun en tierras bajas y son transmitidos a su descendencia.

Otra causa conocida del SHP en pollos es la exposición a bajas temperaturas (ejemplo 16 centígrados o menos) (Mejía, 1982; Pan *et al.*, 2005). Para Padkel *et al.*, (2005) existe una correlación genética entre la mortalidad y el hematocrito de los pollos bajo condiciones de baja temperatura ( $r= 0.72$ ). Demostrando que pollos sometidos a bajas temperatura con hematocritos altos son más susceptibles de morir por ascitis (41%), que los que poseen hematocritos moderados.

Una respuesta esencial de adaptación a la hipoxia crónica tanto en aves como en mamíferos es el incremento en la ventilación, que depende de la actividad periférica de quimiorreceptores particularmente ubicados en los cuerpos carotídeos. Estos recolectan información sensorial sobre cambios en la concentración de oxígeno arterial,  $CO_2$  y pH, que envían al tallo neuronal cerebral que regula la respiración (Engelhard *et al.*, 2005). En condiciones de normoxia e hipoxia, la expresión de los quimiorreceptores está regulada por el factor inducido por hipoxia 1 (HIF1), un factor de transcripción, que desde 1992 fue reconocido como regulador homeostático de oxígeno a nivel celular (Semenza, 2004). Bajo condiciones de hipoxia, el HIF1 subunidad alfa (HIF1 $\alpha$ ), se acumula en el núcleo de las células endoteliales de los vasos pulmonares, en las células de órganos hematopoyéticos y enterocitos; donde la formación de heterodímeros que se unen a secuencias consenso de elementos de respuesta a la hipoxia (*HREs: hypoxic response elements*), constituidos por los promotores de genes blanco como: *ET-1* (Kakinuma *et al.*, 2001), *EPO* (eritropoyetina) (Semenza, 2004; Smith *et al.*, 2008) y *DMT1* (transportador de metales bi-valentes-1) (Li *et al.*, 2008), incrementan su expresión; respuesta de adaptación de las células a condiciones de hipoxia

crónica que genera cambios hematológicos, respiratorios, cardiovasculares y aumento del transporte de hierro.

Para probar la función del factor de transcripción, se han utilizado ratones con el gen *HIF1 $\alpha$  mutado* (*HIF1 $\alpha$ <sup>+/-</sup>*) y silvestre, expuestos a hipoxia crónica (10% de oxígeno) de 1 a 6 semanas. Los ratones *HIF1 $\alpha$ <sup>+/-</sup>* desarrollaron policitemia, comparados con el tipo silvestre. El efecto es consistente con la identificación inicial de *HIF1 $\alpha$*  como activador del gen *EPO* que codifica para la elaboración de eritropoyetina. El desarrollo de hipertensión pulmonar debida a la hipoxia, se manifestó por presencia de hipertrofia ventricular derecha y un incremento de la presión ventricular en ratones *HIF1 $\alpha$ <sup>+/-</sup>*. A las 3 semanas de exposición a la hipoxia crónica los ratones *HIF1 $\alpha$ <sup>+/-</sup>* también presentaron arteriolas pulmonares pequeñas, consecuencia de la remodelación inducida por la hipoxia, con un aumento en el número de vasos completamente muscularizados y pared media reducida. El diámetro luminal de arteriolas pulmonares se redujo por despolarización de las células musculares lisas generando vasoconstricción e hipertrofia de las mismas (Semenza, 2000). Los cuerpos carotídeos aislados de los ratones *HIF1 $\alpha$ <sup>+/-</sup>* mostraron poca actividad nerviosa con 12% de oxígeno. En contraste, los cuerpos carotídeos del genotipo silvestre, mostraron una actividad aumentada cuando se expusieron a hipoxia química, demostrando que la deficiencia parcial del gen *HIF1 $\alpha$*  (*HIF1 $\alpha$ <sup>+/-</sup>*), resulta en la pérdida dramática y específica de la sensibilidad de los cuerpos carotídeos por el oxígeno (Semenza, 2004). Alteraciones en el desarrollo embrionario del corazón y fallas en la actividad cardiaca, también han sido probadas en ratones con el gen inactivo (*HIF1 $\alpha$ <sup>-/-</sup>*). Los estudios establecen que la expresión específica de *HIF1 $\alpha$*  por miocitos cardiacos es fundamental para activar la transcripción basal de múltiples genes en normoxia, debido a que la expresión de estos genes en el corazón es sensible a los niveles fisiológicos de oxígeno, así la pérdida de la transcripción basal del *HIF1 $\alpha$* , tiene efectos deletéreos en la actividad cardiaca, energética, angiogénesis (Huang *et al.*, 2004) y en el anormal desarrollo del órgano embrionario que incluyen malformación ventricular (Wenger, 2000), de los senos



venosos, atriales y del canal atrioventricular (Compernelle *et al.*, 2003). La expresión del *HIF1 $\alpha$*  y de la subunidad beta (*HIF1 $\beta$* ), también han sido cuantificadas para probar su expresión a nivel cardiaco en embriones de pollos sometidos a hipoxia crónica (24 horas a 15% de O<sub>2</sub>), concluyendo que la expresión de *HIF1 $\alpha$*  incrementa un 400% y *HIF1 $\beta$* : 35%, sugiriendo que los RNAm de estos genes contribuyen con la respuesta fisiológica del corazón durante estados prologados de hipoxia (Catron *et al.*, 2001).

El aumento en la expresión del gen *ET-1* en el endotelio vascular pulmonar, causado por la unión en *cis* del *HIF1 $\alpha$* , induce un poder vasoconstrictor 10 veces más potente que el de la angiotensina-1 sobre las células del músculo liso vascular. La función principal de ET-1 es la modulación del tono vascular de los pulmones. Éste y otros efectos (proinflamatorios, profibrosis y acción mitótica), son mediados a través de 2 tipos de receptores ET<sub>A</sub> (receptor A de Endotelina) y ET<sub>B</sub> (receptor B de Endotelina). Los receptores ET<sub>A</sub> están localizados en el músculo liso vascular y predominan a lo largo de la arteria pulmonar, son responsables de inducir vasoconstricción y proliferación celular. Los ET<sub>B</sub> están presentes en las células endoteliales y músculo liso de las vías aéreas altas, en los pulmones se ubican en los capilares y en el tejido del parénquima alveolar, interviniendo en la relajación vascular, activados por la difusión de óxido nítrico y la prostaciclina (Baltazares *et al.*, 2005).

A grandes altitudes, la ET-1 es una de las responsables del incremento en la presión arterial pulmonar y capilar por vasoconstricción. En consecuencia, los líquidos atraviesan la pared endotelial hacia el espacio intersticial, ocasionando problemas respiratorios (Modesti *et al.*, 2006). Estudios de asociación en los humanos, sugieren que el polimorfismo G/T (cambio de Guanina a Timina) en el codón 198 del exón 5 en el gen *ET-1* que sustituye el aminoácido Lisina (*Lys*) por Asparagina (*Asn*) en la proteína, está asociado a hipertensión pulmonar (Jin *et al.*, 2003). Esta variación también ha sido asociada con el índice de masa corporal, sugiriendo que este polimorfismo contribuye con la patogénesis de la hipertensión en pacientes con sobrepeso (Dong *et al.*, 2004). Los niveles altos de ET-1

también han sido asociados con lesión microvascular y fallas en la perfusión cardiaca (Freixa *et al.*, 2011). En la hipertensión pulmonar, se ha descrito como la responsable de la contracción e hipertrofia de las células musculares lisas, asociados con el incremento del tono vascular por vasoconstricción y reducción del diámetro luminal por la hipertrofia (Semenza, 2000). En ratones, Kakinuma *et al.*, (2001), encontraron que la expresión de ET-1 se incrementa a nivel cardiaco por unión de HIF1 $\alpha$  a HRE en el promotor, como resultado de una mala adaptación cardiaca durante falla cardiaca por inapropiado metabolismo energético. En pollos, Groenendijk *et al.*, (2008) concluyeron tras realizar cierres venosos en embriones, que los cambios hemodinámicos y de alteración en los patrones y niveles de expresión de ET-1, están involucrados con defectos cardiovasculares. Los resultados del trabajo de investigación de Gómez *et al.*, (2007) sugieren que los genes *ET-1*, *ET<sub>A</sub>*, *CTGF* (*factor de crecimiento de tejido conectivo*) y *AM* (*Adrenomedulina*), posiblemente desempeñan un papel importante en la fisiopatología de la hipertensión pulmonar, al demostrar por primera vez que la expresión del RNAm de estos genes (*ET-1*, *ET<sub>A</sub>*, *CTGF* y *AM*) se incrementa significativamente ( $p < 0.001$ ) en los pulmones de pollos de engorde con hipertensión pulmonar.

El aumento en la expresión de *ET-1* excluye temporalmente la expresión del gen *eNOS* en el endotelio vascular (Groenendijk *et al.*, 2008). La enzima óxido nítrico sintasa endotelial o tres (NOS3), produce ON (óxido nítrico) a partir de L-arginina en el endotelio pulmonar (Ischiropoulos, 1998; Sierra *et al.*, 2004). El ON sintetizado en los pulmones es un importante vasodilatador que regula el tono vascular pulmonar y la presión sanguínea en humanos (Förstermann *et al.*, 1998), lo cual predispone a un cuadro de hipertensión pulmonar cuando su producción no es adecuada (Wang *et al.*, 2002). Entre las funciones del ON se destaca una importante habilidad para regular la expresión de genes por vías diferentes, estimula respuestas inmunológicas e inflamatorias y actúa como un factor antiproliferativo en la diferenciación de tejidos y desarrollo de órganos (Hemish *et al.*, 2003). En humanos, recientemente se demostró que las alteraciones en el

gen *eNOS* afectan el metabolismo del ON. Estudios realizados por Miyamoto *et al.*, (1998) identificaron la variante Glutamina 298 (*Glu*) a ácido Aspártico (*Asp*) en el exón 7 del gen *NOS3* y demostraron que se asocia con infarto del miocardio. Además sugieren un factor genético de susceptibilidad luego de examinar un número variable de repeticiones en grupo (*VNTRs: variable number of tandem repeats*) en el intrón 4, junto a dos polimorfismos más identificados en los intrones 18 y 23.

Hyndman *et al.*, (2002), encontraron otro punto de mutación en el extremo 5' del gen *NOS3* en los humanos, en el que por transición, cambia el nucleótido T-786 por C; al igual que la variante Glu298Asp (conversión de G-298/T en el gen *NOS3*, el cual introduce un ácido aspártico en lugar de un residuo ácido glutámico). Esta nueva variante también se asocia con espasmo arterial coronario. Ellos concluyeron que el alelo C encontrado en la población hipertensa (106/705) contribuye a incrementar el riesgo de sufrir hipertensión. En los pollos de engorde, Moreno de Sandino (2004), midió la expresión de óxido nítrico en arteriolas pulmonares de 50 y 200 micrómetros de pollos hipertensos y sin hipertensión, concluyendo que en los pulmones de pollos hipertensos existe una menor actividad de la enzima *NOS3*. El trabajo además suministra información sobre los índices cardiacos (IC). Estos estarían inversamente relacionados ( $P < 0.01$ ) con la actividad de la enzima *NOS3*, es decir: a menor actividad de la enzima, mayor IC encontrado en pollos hipertensos. Gómez en 2008, reportó que el nivel del RNAm de los genes *eNOS* y *ET<sub>A</sub>* está aumentado en los pulmones de los pollos sin hipertensión pulmonar.

### **1.3.1 Genes candidatos**

Comprender el factor genético que influye en la manifestación del SHP en pollos de engorde requiere de una metodología en la que se incluya un análisis de asociación genética junto a la implementación de herramientas para la identificación de SNPs. Con esta metodología se podría establecer el papel del componente genético con respecto a los factores ambientales en el riesgo de

desarrollar enfermedad (Wyszynski, 1998; Iniesta *et al.*, 2005; Sevilla, 2007). Basados en la revisión, las investigaciones prueban el papel de los genes *ET-1*, *NOS3* y *HIF1 $\alpha$*  en la susceptibilidad genética para desarrollar hipertensión pulmonar en humanos (Miyamoto *et al.*, 1998; Hyndman *et al.*, 2002; Jin *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2004), en ratones (Semenza, 2004; Compornolle *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2004) y en pollos (Catron *et al.*, 2001; Moreno de Sandino, 2004; Gómez *et al.*, 2007; Groenendijk *et al.*, 2008; Areiza, 2010). Estos genes podrían ser los candidatos para empezar a desarrollar trabajos de asociación genética en los que se relacionen los polimorfismos con la enfermedad en líneas comerciales de pollo de engorde, debido a que la posible existencia de variaciones en cada uno de estos genes candidatos, daría origen a genotipos en la población de estudio que podría conducir a la variación fenotípica de susceptibilidad al SHP.

- **Gen Endotelina-1 (*ET-1*):** En pollos domésticos el gen se localiza en el contig 29.363 del cromosoma 2 (GGA2). Entre el par de bases (pb) 63.816.357 – 63.819.872. Posee 4 exones y 3 intrones; la longitud del transcripto es de 627 pb y la proteína 191 residuos. El gen es ortólogo en el humano, el perro doméstico, el bovino y el caballo (*gen Ensembl*: ENSGALG00000012735; *Gene ID*: 420854). Entre sus funciones biológicas están: responder a la hipoxia y organizar el sistema de vasos sanguíneos, regular la presión sanguínea y la vasoconstricción, la proliferación de células musculares lisas, el desarrollo del músculo estriado y despolarización de la membrana de las células musculares lisas (*Transcripto ID*: ENSGALT00000020785).
- **Gen Oxido nítrico endotelial (*eNOS*) o tres (*NOS3*):** El gen en pollos no posee ubicación cromosómica conocida, no ha sido secuenciado por completo, aunque existe en base de datos una secuencia de ensamble de referencia basada en el contig 2.1 del *Gallus gallus* con *Gene ID* 776984 y una longitud total de 2.881 pb, con un producto proteico de 138 aminoácidos con código de acceso XP\_001236470. No se reportan SNPs en las bases de datos EST. En alineamientos múltiples esta secuencia reporta homología con la secuencia del

---

gen *NOS3* del *Homo sapiens* y el *Bos Taurus*. Entre sus funciones biológicas esta el desarrollo de los pulmones, regulación negativa del transporte del ión potasio, angiogénesis y señales de transducción (*Gene ID* 776984: [http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/term\\_details?term=GO:0004517](http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/term_details?term=GO:0004517)).

- **Gen Factor inducido por hipoxia 1 $\alpha$  (*HIF1 $\alpha$* ):** HIF1 $\alpha$  es un factor de transcripción que regula la respuesta de adaptación a la hipoxia. Se une a secuencias 5'-A/GCGTG-3' de HRE, ubicados corriente arriba (Wenger, 2000; Brüner y Zhou, 2003) o dentro de los promotores de genes blanco (*Gene ID* 374177: <http://amigo.geneontology.org/cgibin/amigo/termdetails.cgi?term=GO%3A0001666>). El acceso de la proteína de unión al ADN en la cromatina, depende de la localización precisa de estos elementos en la superficie del nucleosoma (Orphanides y Reinberg, 2002). Una vez activos por la unión del HIF1 $\alpha$ , interactúan con otros componentes de la maquinaria de transcripción para aumentar la eficiencia de la RNA polimerasa II, controlando así, los niveles de expresión de los genes y la respuesta al estímulo ambiental, activando cambios de estado o actividad de una célula o un organismo en términos de movimiento, secreción, producción de enzimas y expresión de genes como consecuencia al estímulo inducido por muy baja tensión de oxígeno conocido como hipoxia, definida como la declinación del nivel normal de O<sub>2</sub> (normoxia 20.8-20.95%). El resultado, adaptación metabólica de la célula y del organismo (*Gene ID* 374177: <http://amigo.geneontology.org/cgibin/amigo/termdetails.cgi?term=GO%3A0001666>; *Transcripto Ensembl*: ENSGALT00000019364). El gen se encuentra en el GGA5 y posee 17 exones. Existen 3 cortes y empalmes alternativos y el factor HIF1, la subunidad  $\alpha$  es producto de los 17 exones (6.564 pb) para una proteína de 810 residuos (*gen Ensembl*: ENSGALT00000011870; *Gene ID*: 374177).

### 1.3.2 Señal de regulación de la expresión de los genes candidatos en hipoxia

La adaptación de un organismo a la carencia de oxígeno, tiene un amplio rango de respuesta que incluyen mecanismos fisiológicos, metabólicos y moleculares (Stroka *et al.*, 2001).

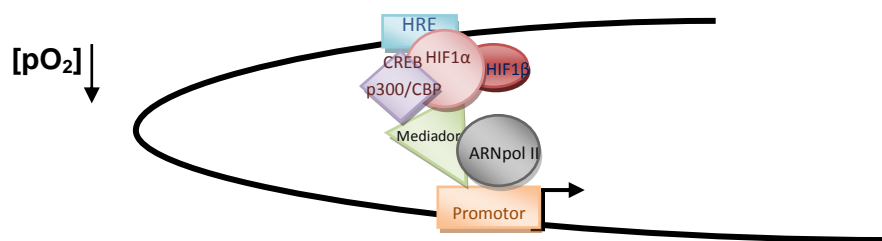
El *HIF1 $\alpha$* , es a nivel molecular el factor más importante en la respuesta celular (Mazure *et al.*, 2004), local y sistémica (Wenger, 2000) a la hipoxia. Pertenece a la familia de factores de transcripción que están formados por 2 hélices alfa unidas por una lámina beta (bHLH) y dominios PAS (PER-ARNT-SIM) en su extremo N-terminal. En el extremo C-terminal tiene dominios requeridos para la degradación y transactivación dependientes de oxígeno (ODDD) (Kaluz *et al.*, 2008), más dominios de transactivación en C-terminal (C-TAD) y N-terminal (N-TAD) (Mazure, *et al.*, 2004).

En normoxia, la hidroxilación de los residuos Prolina<sup>402</sup> (P402), Prolina<sup>564</sup> (P564) y Asparagina<sup>803</sup> (N803) del extremo C-terminal de la subunidad  $\alpha$  del HIF1, son necesarios para bloquear la interacción de proteínas de unión co-activadoras CREB (elementos de unión activados por cAMP) y p300/CBP y para el reconocimiento por la ubiquitina ligasa E3 que lo transporta para su degradación en el proteosoma 26S (Semenza, 2004). La hidroxilación es llevada a cabo por las enzimas 2-oxoglutarato y dioxigenasas dependientes de hierro, las cuales gobiernan la desestabilización de la molécula. Estas enzimas sensoras de O<sub>2</sub>, catalogadas como proteínas de dominios proli-hidroxilasa (PHDs), son las encargadas de reducir los residuos de P<sup>402</sup> y P<sup>564</sup> en los dominios de transactivación ODDD y N-TAD, suministrando un motivo de reconocimiento para la unión de pVHL (proteína supresora de tumores von Hippel-Lindau) y de la E3 (Mazure *et al.*, 2004).

Pero, en condiciones en las que la tasa de oxígeno llega a ser limitante, la fracción que debe ser hidroxilada declina por la inhibición de la 2-oxoglutarato dependiente de oxigenasas, que de acuerdo con la PO<sub>2</sub> (presión de O<sub>2</sub>) hidroxila los residuos específicos de prolina y Asparagina (Kaluz *et al.*, 2008).

Al estar inhibidas las oxigenasas por la hipoxia, el HIF1 $\alpha$  se acumula en el citoplasma, donde el factor de transcripción FIH1 $\beta$  (factor de transcripción inducido por hipoxia subunidad beta) denominado factor de translocación nuclear (ARNT), se une para formar un heterodímero a los dominio PAS, al que también se unen las proteínas CREB-p300/CBP al no ser hidroxilado el residuo N<sup>803</sup> por acción de la enzima asparaginil-hidroxilasa, también dependiente de O<sub>2</sub> y hierro (Kaluz *et al.*, 2008). Estas proteínas co-activadoras son necesarias para desestabilizar la cromatina y el HIF1 $\alpha$  pueda tener acceso a las secuencias de unión en el ADN (Orphanides y Reinberg, 2002). Esta acción estabiliza la molécula para ser llevada hasta el núcleo de la célula a través de los poros de la membrana nuclear y luego unirse a los HRE (Semenza, 2004; Kaluz *et al.*, 2008) y efectuar una *trans*-activación de los genes *ET1* (Caramelo *et al.*, 2006) y *NOS3* (Searles, 2006) que permite una robusta respuesta de transcripción (figura 1-1).

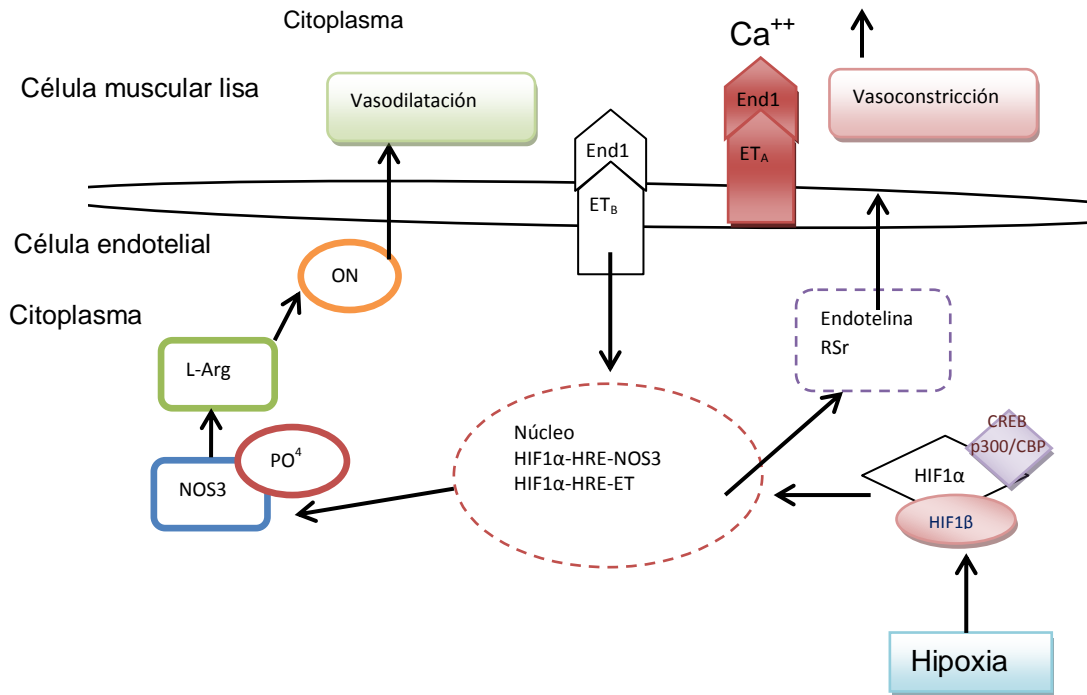
**Figura 1-1. Señal de regulación de la transcripción en el núcleo de células endoteliales.** Estabilización del factor HIF1 $\alpha$  en condiciones de hipoxia y su unión a HRE, que activa la transcripción por la acción de un mediador. Adaptado de Wenger, 2000; Orphanides y Reinberg, 2002, Semenza, 2004; Mazure *et al.*, 2004 y Kaluz *et al.*, 2008).



El RNAm del gen *ET-1* codifica la preproendotelina (PPET de 212 aa) que a través de la acción proteolítica de una endopeptidasa es transformada en la Endotelina de 39 aa (*Big-ET-1*). Esta fracción posteriormente sufre la acción de la enzima convertidora de endotelinas (ECE-1) que rompe la unión en la posición triptófano 21 (Trp21) - valina 22 (Val22) produciendo el péptido bioactivo ET-1 de 21 aa. La ET-1 no se almacena dentro de las células, sino que ante el estímulo hipóxico, en este caso específico, su síntesis es inducida en minutos y es secretada a través de una vía constitutiva, probablemente vía gránulos que involucra el retículo endoplasmático rugoso. La liberación de ET-1 estimula los receptores tipo ET<sub>A</sub> que se encuentran sobre las células del músculo liso vascular y en los miocardocitos, activando la fosfolipasa C que lleva al aumento en la concentración de Ca<sup>++</sup> intracelular y produce vasoconstricción de las células musculares lisas del endotelio vascular pulmonar. La estimulación de los ET<sub>B</sub>, con igual afinidad por la ET-1, median el incremento de la producción de ON (Baltazares *et al.*, 2005). La unión de HIF1 $\alpha$  al HRE del gen *NOS3*, aumenta la tasa de transcripción (Coulet *et al.*, 2003), obedeciendo a la señal emitida por los receptores ET<sub>B</sub> y al estímulo externo. En el citoplasma, el aumento de la actividad de la enzima eNOS está asociado a la fosforilación del residuo de serina 1177/1179, para la síntesis de ON a través de L-arginina. El ON producido se disocia en la membrana y causa vasodilatación (Fulton *et al.*, 2001; Fleming y Busse, 2003; Gonçalves *et al.*, 2009) (figura 2-1).



**Figura 2-1. Síntesis de endotelina 1 y NOS3 en la célula endotelial.** Resumen de la señal de transcripción de los genes *ET-1* y *NOS3* modulada por HIF1 $\alpha$  en condiciones de hipoxia para generar vasoconstricción y vasodilatación.



## 1.4 Referencias

AREIZA R. R. A. 2010. Posible papel del grado de vascularización pulmonar en la resistencia/ susceptibilidad a la hipertensión pulmonar en una estirpe comercial de pollo de engorde. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Doctorado en Ciencias-Salud Animal. Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, D.C.

BALTAZARES L. M., RODRIGUEZ C. J., ORTEGA M. J., SOTRES V. A., BALTAZARES L. M. E. 2005. Sistema endotelina. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 18(4):308-320.

BROWN R. A., HUBBARD S. J., TICLE C., y WILSON S. A. 2003. The chicken as a model for large-scale analysis of vertebrate gene function. *Nature* 4:87-98.

BRÜNE B., y ZHOU J. 2003. The role of nitric oxide (NO) in stability regulation of hipoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ). *Current Medicinal Chemistry* 10: 845-855.

BURT D. W. 2005. Chicken genome: current status and future opportunities. *Genome research*, 15:1692-1698.

BURT D. W., WHITE S. J. 2007. Emergence of the chicken as a model organism: implications for agriculture and biology. *Poultry science*, 86:1460-1471.

BURTON R. R., y SMITH A. H. 1967. The effect of polycythemia and chronic hypoxia on heart mass in the chicken. *Journal of applied Physiology* 22(15):782-785.

CANTOR C. R. 2005. The use of genetic SNPs as new diagnostic markers in preventive medicine. *Annals New York Academy of Sciences* 1055:48-57.

CARAMELO C., PEÑA D. J. J., CASTILLA A., JUSTO S., J. DE SOLIS A., NEIRA F., PEÑATE S., GONZALES-PACHECO F. R. 2006. Respuesta a la hipoxia. Un mecanismo sistemático basado en el control de la expresión genética. *MEDICINA* (Buenos Aires) 66:155-164.

CARRE W., WANG X., POTER T. E., NYS Y., TANG J., BERNBERG E., MORGAN R., BURNSIDE J., AGGREY S. E., SIMON J., y COGBURN L. A. 2006. Chicken genomics resource: sequencing and annotation of 35,407 ESTs from single and multiple tissue cDNA libraries and CAP3 assembly of a chicken gene index. *Physiol Genomics* 25:514-524.

CATRON T., MENDIOLA M. A., SMITH S. M., BORN J., y WALKER M. K. 2001. Hypoxia regulates avian cardiac Arnt and HIF-1 $\alpha$  mRNA expression. *Biochemical and Biophysical Research communications* 282:602-607.

COMPERNOLLE V., BRUSSELMANS K., FRANCO D., MOORMAN A., DEWERCHIN M., COLLEN D., CARMELIET P. 2003. Cardia bifida, defective heart development and abnormal neural crest migration in embryos lacking hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Cardiovascular Research* 60:569-579.

CUEVA S., SILLAU H., VALENZUELA A., y PLOOG H. 1974. High altitude induced pulmonary hypertension and right heart failure in broilers chicken. *Research in Veterinary Science* 16(6):370-374.

COULET F., NADAUD S., AGRAPART M., y SOUBRIER F. 2003. Identification of hypoxia-response element in the human endothelial nitric-oxide synthase gene promoter. *The Journal of Biological Chemistry* 278(47):46230-46240.

DEQUÉANT M-L., y POURQUIÉ O. 2005. Chicken genome: new tools and concepts. *Developmental dynamics* 232:883-886.

DONG Y., WANG X., ZHU H., TREIBER F. A., SNIEDER H. 2004. Endothelin-1 gene and progression of blood pressure and left ventricular mass: longitudinal findings in youth. *Hypertension* 44(6):884-890. *Abstract*.

DRUYAN S., SHLOSBERG A., CAHANER A. 2007. Evaluation of growth rate, body weight, heart rate, and blood parameters as potential indicators for selection against susceptibility to the ascites syndrome in young broilers. *Poultry Science* 86:621-629.

EMARA M. G., y KIM H. 2003. Genetic markers their application in poultry breeding. *Poultry Science* 82:952-957.

ENGELHARDT v. W., BREVES G. 2005. Fisiología veterinaria, capítulo 11. Editorial ACRIBIA, S.A. Zargosa, España.

FLEMING I., y BUSSE R. 2003. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endotelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol regul Integr Comp Physiol* 284:R1-R12.

FÖRSTERMANN U., BOISSEL J. P., y KLEINERT H. 1998. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *The FASEB Journal* 12:773-790.

FREIXA X., HERAS M., ORTIZ J. T., ARGIRO S., GUASCH E., DOLTRA A., JIMÉNEZ M., BETRIU A., y MASOTTI M. 2011. Utilidad de la determinación de endotelina-1 en el infarto agudo de miocardio. *Rev Esp Cardiol.* 64(2):105–110

FULTON D., GRATON J-P., y SESSA W. C. 2001. Post- translational control of endothelial nitric synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 299(3):818-824.

GÓMEZ R. A. P. 2008. Regulación de la expresión de la endotelina 1 y su receptor ETA y de la sintasa de óxido nítrico en pulmones de pollo de engorde sanos y con hipertensión arterial pulmonar por hipoxia hipobárica. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Doctorado en Ciencias-Salud Animal. Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, D.C.

GOMEZ A. P., MORENO A., IGLESIAS P., CORAL P., HERNANDEZ A. 2007. Endothelin 1, its Endothelin type A receptor, connective tissue growth factor platelet growth factor and adrenomedullin expression in longs of pulmonary hypertensive and nonhypertensive chickens. *Poultry Science* 86:909-916.

GONÇALVES D. R., NEGRÃO C. E., KRIEGER M. H. 2009. óxido nítrico y sistema cardiovascular: activador celular, reactividad vascular y variante genética. *Arq Bras Cardiol* 96(1): 68-75.

GROENEN M. A. M., CHENG H. H., BUMSTEAD N., BENKEL B. F., ELWOOD BRILES W., BURKE T., BURT D. W., CRITTENDEN L. B., DODGSON J., HILLEL J., LAMONT S., PONCE de LEON A., SOLLER M., TAKAHOSHI H., y VIGNAL A. 2000. A consensus linkage map of the chicken genome. *Genome Research* 10:137-147.

GROENENDIJK B. C. W., STEKELENBURG-de Vos S., VENNEMANN P., WLADIMIROFF J. W., NIEUWSTADT F. T. M., LINDKEN R., WESTERWEEL J., HIERCK B., URSEM N. T. C., POELMANN R. E. 2008. The endothelin-1 pathway and the development of cardiovascular defects in the haemodynamically challenged chicken embryo. *Journal of Vascular Research* 45: 54-68.

HEMISH J., NAKAYA N., MITTAL V., y ENIKOLOPOV G. 2003. Nitric oxide activates diverse signaling pathways to regulate gene expression. *Journal of biological chemistry* 278(43):42321-42329.

HERNÁNDEZ A. 1982. Influencia de altitud, el sexo, la raza y el nivel energético de la ración en la incidencia de la ascitis de origen hipóxico en pollos de engorde. *Revista Facultad Medicina Veterinaria y de Zootecnia* 35:1-18

HUANG Y., HICKEY R. P., YEH J. L., LIU D., DADAK A., YOUNG L. H., JOHNSON R. S., y GIORDANO J. F. 2004. Cardiac myocytes-specific HIF-1 $\alpha$  deletion alters vascularization, energy availability, calcium flux, and contractility in the normoxic heart. *The FASEB journal* (4):1510-1531.

HYNDMAN M., PARSONS H., VERMA S., BRIDGE J., EDWORTHY S., JONES C., LONN E., CHARBONNEAU F., ANDERSON T. 2002. The T-786 mutation in endothelial nitric oxide synthase is associated with hypertension. *Hypertension* 39:919-922.

INIESTA R., GUINO E., MORENO V. 2005. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gac Sanit* 19(4):333-41.

INTERNATIONAL CHICKEN POLYMORPHISM MAP CONSORTIUM 2004. A genetic variation map for chicken with 2.8 million single-nucleotide polymorphisms. *Nature* 432:717-722.

ISCHIROPOULOS H. 1998. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys* 356. *Abstract*.

JIN J. J., NAKURA J., YAMAMOTO M., TABARA Y., YAMAMOTO Y., IGASE M., KOHARA K., MIK T. 2003. Association of endothelin-1 gene variant with hypertension. *Hypertension* 41(1):163-167. *Abstract*.

JURINKE C., DENISSENKO M. F., OETH P., EHRICH M., VAN DEN BOOM D., CANTOR C. R. 2005. A single nucleotide polymorphism based approach for the identification and characterization of gene expression modulation using MassARRAY. *Mutation Research* 573:83-95.

KAKINUMA Y., MIYAUCHI T., YUKI K., MURAKOSHI N., GOTO K., YAMAGUCHI I. 2001. Novel molecular mechanism of increased myocardial endothelin-1 expression in the failing heart involving the transcriptional factor hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  induced for impaired myocardial energy metabolism. *Circulation* 103:2387-2394.

KALUZ S., KALUZOVÁ M., y STANBRIDGE. 2008. Regulation of gene expression by hipoxia: integration of the HIF-transduced hypoxic signal at the hipoxia-responsive element. *Clin Chim Acta*. Septiembre;395(1-2):6-13.

LI Z., LAI Z., YA K., FANG D., WING H. Y., LEI Y., MING Z. Q. 2008. Correlation between the expression of divalent metal transporter 1 and the content of hypoxia-inducible factor-1 in hypoxic HepG2 cells. *J. Cell. Mol. Med.* 12(2):569-579.

LIPKIN E., FULTON J., CHENG H., YONASH N., y SOLLER M. 2002. Quantitative trait locus mapping in chickens by selective DNA pooling with dinucleotide microsatellite markers by using purified DNA and fresh or frozen red blood cells as applied to marker-assisted selection. *Poultry Science* 81:283-292.

MAZURE N. M., BRAHIMI-HORN M. C., BERTA M. A., BENIZRI E., BILTON R. L., DAYAN F., GINOUVÉS A., BERRA E., POUYSSÉGUR J. 2004. HIF-1: master and commander of hypoxic world a pharmacological approach to its regulation by siRNAs. *Biochemical Pharmacology* 68:971-980.

MEGENS H-J., CROOIJMANS R. P.M.A., BASTAANSEN J. W.M., KERSTENS H. HD., COSTER A., JALVING R., VEREIJKEN A., SILVA P., MUIR W. M., CHENG H. H., M HANOTTE O., y GROENEN M. AM. 2009. Comparison of linkage disequilibrium and haplotype diversity on macro- and microchromosomes in chicken. *BMC Genetics* 10:86-97.

MEJÍA G. 1982. Influencia del frío en la ascitis de origen hipóxico en los pollos de engorde. Trabajo de Grado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Bogotá D.C.

MIYAMOTO Y., SAITO Y., YOSHIMURA M., SHIMASAKI Y., NAKAYAMA M., KAMITANI S., HARADA M., ISHIKAWA M., KUWAHARA K. et al. 1998. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated essential hypertension. *Hypertension* 32:3-8.

MODESTI A. P., VANNI S., MORABITO M., MODESTI A., MARCHETTA M., GAMBERI T., SOFI F., SAVIA G., MANCIA G., GENSINI G. F., PARATI G. 2006. Role of endothelin-1 in exposure to high altitude: acute mountain sickness and endothelin-1 (ACME-1) study. *Circulation* 114:1410-1416.

MORENO de SANDINO M.; HERNANDEZ V. A. 1985. Variación cardiopulmonar y en valores de hemoglobina y hematocrito durante la hipoxia en pollos

comerciales y criollos. *Revista Facultad Medicina Veterinaria y de Zootecnia* 38(1): 11-20

MORENO de SANDINO M. 2004. Posible papel del óxido nítrico (ON) en el síndrome de hipertensión pulmonar hipóxica aviar. Tesis doctoral en Ciencias-Salud Animal. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Departamento de Ciencias para la Salud Animal, Bogotá D.C.

OLKOWSKI A. A. 2007. Pathophysiology of heart failure in broilers chickens: structural, biochemical, and molecular characteristics. *Poultry Science* 86:999-1005.

ORPHANIDES G., y REINBERG D. 2002. A unified theory of gene expression. *Cell* 108:439-451.

PADKEL A., VAN ARENDONK J. A. M., VEREIJKEN A. L. J., y BOVENHUIS H. 2005. Genetic parameters of ascites-related traits in broilers: effect of cold and normal temperature conditions. *British Poultry Science* 46(1):335-42.

PAGANI F. y BARALLE F. E. 2004. Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers. *Nature Reviews* 5:389-396.

PAN J. Q., LI J. C., SUN W. D., y WANG X. L. 2005. Effects of early feed restriction and cold temperature on lipid peroxidation, pulmonary vascular remodeling and ascites morbidity in broilers under normal and cold temperatures. *British Poultry Science* 46:374-381.

PULIDO L. M. 1996. Ascitis aviar de origen hipóxico: evaluación cronológica del daño cardíaco mediante la técnica electrocardiografía y posibles correlaciones con los valores de índice cardíaco, hematocrito y hemoglobina. Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de Magister Scientiae en Salud Animal y Producción animal. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina



Veterinaria y de Zootecnia. Departamento de Ciencias para la Salud Animal, Bogotá D.C.

RABIE T. 2004. Pulmonary hypertension syndrome in chicken: peeking under QTL peaks. *Doctoral thesis. Wageningen University*. The Netherlands. 168 p.

RABIE T. S., CROOIJMANS R. P., BOVENHUIS H., VEREIJKEN A. L., VEENENDAAL T., VAN DER POEL J. J., VAN ARENDONK J. A., PAKDEL A., y GROENEN M. A. 2005. Genetic mapping of quantitative trait loci affecting susceptibility in chicken to develop pulmonary hipertensión syndrome. *Animal Genetic* 36:468-476.

RANGE A. K., McENTEE M. G., y McDEVITT M. R. 2002. Genetic and phenotypic relationships between and within support and demand tissues in a single line of broiler chicken. *British Poultry Science* 43: 518-527.

SAUER S., GUT I. G. 2002. Genotyping single-nucleotide polymorphisms by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of chromatography B*, 782:73-87.

SAUER S. 2006. Typing of nucleotide polymorphisms by MALDI mass spectrometry: principles and diagnostic applications. *Clinica Chimica Acta* 363:95-105.

SEARLES C. D. 2006. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. *Am. J. Physiol. Cell Physiol* 291:C803-C816.

SEMENZA G. L. 2000. Oxigen-regulated transcription factors and their role in pulmonary disease. *Respiratory Research* 1(3):159-162.

SEMENZA L. G. 2004. O<sub>2</sub>-regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory by HIF-1. *J. Appl Physiol* 96:1173-1177.

SEVILLA S. D. 2007. Metodología de los estudios de asociación genética. *Insuficiencia Cardíaca* 2(3):111-114.

SCHMID M., NANDA I., GUTTENBACH M., STEINLEIN C., HOEHN H., SCHARTL M., HAAF T., WEIGEND S., FRIES R., BUERSTEDDE J-M., WIMMERS K., BURT D. W., SMITH J., A'HARA S., LAW A., GRIFFIN D. K., et al. 2000. First report on chicken genes and chromosomes 2000. *Cytogenet Cell Genet* 90:169-218.

SIERRA V. M., GUZMÁN G. A., OLIVARES C. I., TORRES R. Y., HICKS J. 2004. Participación de las especies reactivas del oxígeno en las enfermedades pulmonares. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*; 17(21) Abstract.

SMITH T. G., ROBBINS P. A., y RATCLIFFE P. J. 2008. The human side of hypoxia-inducible factor. *British Journal of Haematology* 141: 325-334.

STROKA D. M., BURKHARDT T., DESBAILLETS I., WENGER R. H., NEIL D. A. H., BAUER C., GASSMANN M., y CANDINAS D. 2001. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *The FASEB Journal* (15):2245-2453.

VÁSQUEZ. V. I. C. 2010. Peso pulmonar, valores de hematocrito y concentración de hemoglobina en pollos de engorde sanos y con hipertensión arterial pulmonar según el tiempo de permanencia y la edad de exposición a hipoxia hipobárica. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. Colombia.

WANG J., WANG X., XIANG R., y SUN W. 2002. Effect of L-NAME on pulmonary arterial pressure, plasma nitric oxide and pulmonary hypertension syndrome morbidity in broilers. *British Poultry Science* 43:615-620.

WENGER R. H. 2000. Mammalian oxygen sensing, signalling and regulation. *The Journal of Experimental Biology* 203:1253-1263.

WYSZYNSKI D. F. 1998. La epidemiología genética: disciplina científica en expansión. *Pan Am J Public Heal* 3(1):26-34.

YE X., McLEOD S., ELFICK D., DEKKERS J. C. M., y LAMONT S. J. 2006. Rapid identification of single nucleotide polymorphisms and estimation of allele frequencies using sequence traces from DNA pools. *Poultry science* 85:1165-1168.

ZHANG H., WU C. X., CHAMBA Y., y LING Y. 2007. Blood characteristics for high altitude adaptation in Tibetan chicken. *Poultry Science* 86:1384-1389.



## **2. Capítulo 2 Asignación de los genes *ET-1* y *NOS3* por ligamiento genético al cromosoma 2 del pollo doméstico**

### **2.1 Introducción**

Uno de los desafíos de la genética aviar es la ubicación de formas alélicas con efecto sobre la susceptibilidad a desarrollar hipertensión pulmonar en líneas comerciales de pollo de engorde. En este orden, los mapas genéticos, mediante asociaciones estadísticas entre los valores fenotípicos y las variantes alélicas de genes candidatos y microsatélites, establecerían la probabilidad de un arreglo lineal del grupo de marcadores sobre una región cromosómica con efecto sobre la susceptibilidad al síndrome de hipertensión pulmonar (SHP).

La tecnología utilizada para mapear genes en los animales domésticos es la misma adoptada para la construcción del mapa del genoma humano, con la ventaja de poder comparar genomas y demostrar que se conservan segmentos en una amplia diversidad de taxa animal que además permite abordar a las especies domésticas como organismos modelos que facilitan la interpretación de mapas humanos (*Brown et al.*, 2003).

En la especie *Gallus gallus* el primer mapa de ligamiento genético fue publicado por Hutt en 1936, que basado en estudios cromosómicos y análisis de segregación logró ubicar 44 loci en 7 grupos de ligamiento en cromosomas autosómicos y uno en el cromosoma Z (*Schmid et al.*, 2000).

Luego, en 1992, Bumstead y Palyga construyeron un segundo mapa basado en RFLPs con 18 grupos de ligamiento (*Levin et al.*, 1994). Más tarde, por el interés que se empieza a mostrar hacia el pollo como un organismo modelo para

enfermedades genéticas complejas humanas, en la vigésima tercera conferencia de la Sociedad Internacional para la Genética Animal (Switzerland, 1992), se constituyó el proyecto para realizar un mapa molecular en la especie. El resultado fue el primer mapa de ligamiento genético consenso basado en los genotipos de tres poblaciones. En el mapa, se localizaron sobre los macrocromosomas 2000 microsatélites, organizados en 50 grupos de ligamiento con un total de 1965 loci mapeados (Schmid *et al.*, 2000; Groenen *et al.*, 2000; Dodgson, 2003; Jacobsson *et al.*, 2004). Este trabajo proporcionó una herramienta invaluable para buscar QTLs en el genoma del pollo.

Pero a pesar de la densidad de marcadores, fueron muchas las regiones cromosómicas con deficiente información en microsatélites, pero más tarde estas se definirían con la secuenciación. Análogo a este nuevo proyecto, ejecutado en el Centro de Secuenciación de Genomas de la Universidad de Washington en 2005, se construyó un mapa de variaciones genéticas, que actualmente contiene 3.624.831 SNPs identificados en tres líneas comerciales: pollo para asaderos, gallinas ponedoras, gallinas de plumaje sedoso y su ancestro común RJF (*Gallus gallus gallus*) (Carre *et al.*, 2006; Burt *et al.*, 2007; <http://chicken.genomics.org.cn/index.jsp>). Con la resecuenciación se confirmó que el 94% de los SNPs hallados son verdaderos, de los cuales el 83% son SNPs no sinónimos (*Internacional Chicken Polymorphism Map Consortium*) y el 70% son comunes por segregación entre las poblaciones evaluadas (Burt *et al.*, 2007). Entre 1930 y 1980, otros métodos empleados en el mapeo de genes fueron: análisis convencional de pedigree (76% de los genes fue mapeado con este método), hibridación *in situ* (19%), hibridación de células somáticas (4%) y marcación específica (nitrato de plata, 1%) (Womack, 1990). Hoy, aunque se ha logrado identificar la actividad celular de una amplia variedad de tejidos gracias a la secuenciación de 400.000 EST y la posibilidad de analizar la expresión genética durante procesos biológicos y de tejidos embrionarios de pollos infectados, resistentes y susceptibles a la enfermedad de Marek por la secuenciación de otras 339.314 EST (Emara y Kim, 2003), entre 5% a 10% de los

genes aun no se encuentran en el ensamble debido al contenido de genes duplicados y regiones ricas en GC de las secuencias faltantes (Burt *et al.*, 2007). *NOS3* y *ET1*, han sido genes implicados en la susceptibilidad a desarrollar hipertensión pulmonar en los humanos (Hyndman *et al.*, 2002; Jin *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2004) y en los pollos (Wang, *et al.*, 2002). Recientemente los RNA mensajeros de estos y otros genes como *CTGF* (*factor de crecimiento de tejido conectivo*), *ET<sub>A</sub>* (*receptor A de Endotelina*) y *AM* (*Adrenomedulina*) fueron asociados con el SHP en pollos de engorde criados a grandes alturas (Gómez *et al.*, 2007; Gómez, 2008). El gen *ET1*, se encuentra ubicado en el cromosoma 2 del pollo (GGA2) pero el gen *NOS3* probablemente por el gran contenido de GC o duplicación, es uno de los genes que en el genoma del pollo no se encuentra localizado sobre algún cromosoma. El objetivo de este trabajo fue construir un mapa de ligamiento preliminar para mapear el gen *NOS3* y el gen *ET1* junto a 4 microsatélites localizados en un QTL asociado al SHP sobre el cromosoma 2, en una línea comercial de pollos de engorde.

## 2.2 Materiales y Métodos

### 2.2.1 Población de estudio

Se utilizaron 117 machos tipo carne F2 de un cruce entre las razas *White Rocks* x *Vantress*, suministradas por Avícola Colombiana, que garantizó la línea comercial, la entrega y el buen estado sanitario de los pollitos al inicio del experimento.

Las aves se alojaron desde el día uno hasta el día 49 en un galpón experimental del Edificio Avícola, propiedad de la Universidad Nacional de Colombia, ubicado a una altura aproximada de 2.638 msnm (presión barométrica = 560 mm Hg) en la ciudad de Bogotá, Colombia. Las condiciones de alojamiento, alimentación y manejo fueron las sugeridas por los manuales de procedimientos para la línea

comercial, la temperatura se mantuvo de manera similar a las explotaciones comerciales de pollos de engorde y se mantuvo entre 18 y 20°C después de la tercera semana de edad a través de un sistema programable y automático. El plan sanitario llevado a cabo fue el establecido por el ICA: Gumboro al día 4, Enfermedad de New Castle (cepa B1) y Bronquitis infecciosa (cepa Massachussets) día 8, revacunándose contra la enfermedad de New Castle al día 18.

### **2.2.2 Sacrificio y Toma de Muestra**

El sacrificio de los pollos se realizó en la línea de sacrificio para pollos en la planta de procesos ICTA, propiedad de la Universidad Nacional de Colombia, con aprobación del Comité de Bioética de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Previo al sacrificio, los animales fueron identificados individualmente mediante marcación adherida al fémur. Antes de la evisceración se realizó la inspección de sacos aéreos y pulmones con el fin de descartar cualquier tipo de lesión visible. Posteriormente, empleando tijeras y pinzas quirúrgicas se extrajo el corazón. Este se depositó en un frasco con formaldehído al 10 %. Cada frasco se rotuló con la fecha del día de toma de muestra, la identificación del ave y el contenido del frasco. Mediante el mismo método se tomaron muestras de hígado y músculo. Estas se depositaron por separado en tubos eppendorf rotulados con el tipo de tejido, fecha, número del animal y se almacenaron a -70°C. Las muestras se emplearon para la extracción de ADN genómico. Los corazones se usarán para determinar el índice cardíaco (IC) que más tarde, en el capítulo 2 se empleará como criterio de selección en estudios de asociación genética.

### **2.2.3 Extracción de ADN genómico**

La extracción se realizó a partir de tejido congelado según el protocolo *salt-extraction* descrito por Aljanabi y Martínez (1997).



La concentración y pureza del ADN se evaluó en fluorómetro marca iQuib© de acuerdo a las instrucciones de manufactura (Invitrogen™, USA). La visualización se realizó en geles de agarosa al 0.8%, teñidos con SYRBgreen® (Invitrogen™, USA). La concentración final de trabajo fue 10 ng/ul ADN en buffer TE 0.1X. El ADN y las muestras adicionales de tejido, se rotularon con el número de identificación de cada individuo, se depositaron en cajas plásticas marcadas con el nombre del proyecto, la fecha de extracción y el responsable de las muestras. Finalmente se almacenaron a -4°C y -20°C respectivamente.

## 2.2.4 Diseño de iniciadores

Cada juego de iniciadores para amplificar los segmentos seleccionados se obtuvo a partir de la información almacenada en la base de datos GenBank: *ET1* (Gene ID: 420854) y *NOS3* (Gene ID: 776984); empleando el software libre PRIMER3 ([http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)), tabla 3-2.

**Tabla 3-2. Secuencia de los iniciadores utilizados en el análisis de los segmentos de los genes *ET1* y *NOS3*.**

Gen	Iniciadores Forward y reverse 5' - 3'	Longitud pb	Gene ID	Región amplificada	Temperatura de Anillamiento
ET1	AGAGACAACATGAAAGTCACC TGCGGGATCATCAGAAGTAG	150	420854	Intrón 3	56
NOS3	CTCGAGGACCAGCTCTGAAG ATCTGGAACACGCAGCTGAT	286	776984	exón1 – intrón1 – exón2	60

Los microsatélites utilizados en la construcción del mapa reportados por Rabie (2004) se resumen en la tabla 4-2.

**Tabla 4-2. Características de los microsatélites utilizados para la construcción del mapa de ligamiento genético.**

Marcador	Longitud en pb	Primer forward 5'-3'	Primer reverse 5'-3'	Temperatura de Anillamiento	alelos	GGA
MCW0314	278-284	GCCAGGCTACACCTCTTAG	GTTGGTATGATGGTATGATGC	58.5	3	2
MCW0245	284-290	ATCTATGGCCACCTCAAAGT	GATCTGTGCTGAACACAGCAG	61	2	2
ADL0164	150-200	TCCTCAGGCCTTTCAACATA	GGTAGCATGAACAAGCATC	58.5	3	2
MCW0282	287-308	GATCCTAAGGTTCTACTACAG	AGTATTTCACTAGTGAAGTACC	58	3	2

### 2.2.5 Amplificación

Las amplificaciones se realizaron por PCR convencional con volumen final de 12.5  $\mu$ l, variando la Taq polimerasa (Promega, USA) utilizada para la amplificación de genes y microsatélites (tabla 5-2).

Para la amplificación se empleó un termociclador MULTIGENE (Labnet, Inc., USA) utilizando las siguientes condiciones: 95°C durante 3 minutos; 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 60 segundos entre 54°C - 60°C, 90 segundos a 72°C y un paso final de 72°C durante 10 minutos.

### 2.2.6 Condición de los geles y Visualización de los alelos

Para visualizar los alelos de los genes, se empleó la técnica SSCP (Scheffield *et al.*, 1993). Para visualizar los polimorfismos en los microsatélites se utilizaron

geles de poliacrilamida en condición denaturante (Taylor, 1997). Las concentraciones Acrilamida: Bis-acrilamida variaron entre 49:1 y 19:1, el tiempo y los watos dependieron del marcador (tabla 6-2).

**Tabla 5-2 Protocolo de amplificación de genes y microsatélites.**

Protocolo PCR	Genes	Microsatélites
<b>Gotaq Green® Master Mix</b> (Promega, USA)	6.3	-
<b>Taq Polimerasa</b> (0.3 unidades; Promega USA)	-	1
<b>dNTPs</b> (1.25 mM de c/u; Promega USA)	-	3
<b>MgCl<sub>2</sub></b> (2.5 mM; Promega USA)	-	1.25
<b>Agua MiliQ</b>	1.7	2.75
<b>Primer F y R</b> (8pmol/ul; sintetizados por Alpha DNA, Canadá)	1	1
<b>ADN</b> (10 ng)	2.5	2.5

**Tabla 6-2. Condiciones denaturantes y no-denaturantes de geles de poliacrilamida**

Marcador	Acrilamida : Bis-acrilamida	Glicerol	Tiempo	Watos
<b>ET1</b>	49:1	5%	8 horas	8
<b>NOS3</b>	29:1	5%	13.3 horas	9
<b>Microsatélites</b>	29:1 a 19:1	-	2.30 a 3 horas	80 - 100

### **2.2.7 Revelado de los Geles**

El revelado se realizó con la técnica de nitrato de plata según protocolo reportado por Taylor (1997). Antes de eliminar la solución de revelado, cada gel fue despegado del vidrio y se salvó en otro previamente protegido con papel celofán frío humedecido con agua corriente. La cara expuesta de cada gel se cubrió con un trozo de igual tamaño de papel humedecido. Se retiraron los excesos de agua y se dejaron secar por 12 horas con el fin de fijarlos.

### **2.2.8 Lectura de genotipos**

Los genotipos fueron leídos y registrados en una base de datos después de ser confirmados por dos lectores diferentes al lector inicial, asignando un número a cada alelo visualizado.

### **2.2.9 Construcción del mapa de ligamiento genético**

Para la construcción del mapa de ligamiento se utilizó el programa de mapeo MAPMAKER/EXP versión 3.0 que genera grupos de ligamiento calculando el *LOD score*. Se acepta ligamiento cuando este valor es igual a 3 para enfermedades mendelianas y 3.6 para enfermedades de herencia compleja con  $p \leq 0.001$  para un par de marcadores (Lincoln *et al.*, 1993).

## Resultados

### Lectura de genotipos

Se identificaron 9 genotipos que fueron registrados con números arábigos: 11, 12, 13, 22, 23, 33, 14, 24 y 34. En la tabla 7-2, se muestran los detalles.

Tabla 7-2. Genotipos de los marcadores para la construcción del mapa de ligamiento

Genotipos Marcador	1 1	1 2	2 2	1 3	2 3	3 3	1 4	2 4	3 4	XX
NOS3	45(0.38)	32(0.27)	4(0.03)	24(0.2)	1(0.008)	-	-	-	-	11(0.09)
ET1	44(0.37)	29(0.24)	4(0.03)	35(0.29)	5(0.04)	-	-	-	-	-
MCW0314	94(0.8)	19(0.16)	-	3(0.02)	-	-	-	-	-	1(0.008)
MCW245	74(0.63)	31(0.26)	2(0.01)	2(0.01)	2(0.01)	-	-	-	-	8(0.06)
ADL0164	50(0.42)	48(0.41)	-	3(0.02)	6(0.05)	-	3(0.02)	3(0.02)	2(0.01)	2(0.01)
MCW0282	16(0.13)	9(0.07)	5(0.04)	36(0.3)	18(0.15)	14(0.11)	-	-	-	33(0.28)

XX : Genotipos no identificados. Entre paréntesis: Frecuencia hallada sobre 117 individuos.

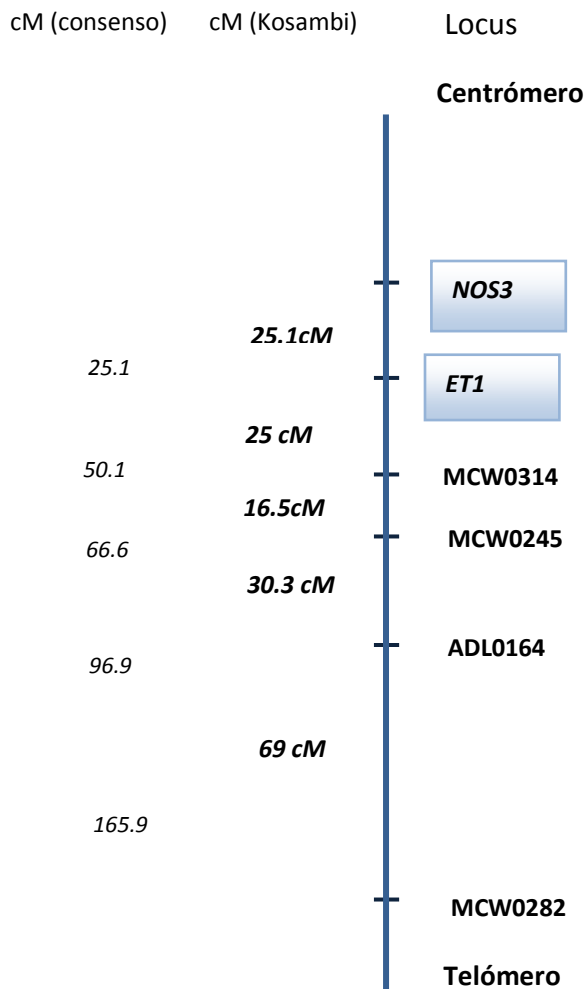
### Mapa de ligamiento

Se formó un grupo de ligamiento con  $Lod > 3.6$  y fracción de recombinación máxima del 50% entre 3 de los 4 microsatélites con los loci *ET1* y *NOS3*, ubicando a los genes *NOS3* y *ET1* sobre el brazo largo del cromosoma 2 (GGA2q). Según este análisis de ligamiento el orden de los marcadores es: centrómero - NOS3 – ET1 – MCW0314 – MCW0245 - ADL0164 – MCW0282 – telómero (figura 3-2). En la tabla 8-2, se resume el análisis de 2 puntos para los marcadores empleados en el mapa de ligamiento.

Tabla 8-2. Análisis de 2 puntos entre marcadores 1 y 2

Marcador 1	Marcador 2	Fracción de recombinación	LOD score	Kosambi cM
NOS3	ET1	0.2	6.44	25.1
ET1	MCW0314	0.2	9.8	25
MCW0314	MCW245	0.14	20.9	16.
MCW245	ADL0164	0.24	8.0	30.3
ADL0164	MCW0282	$\geq 0.5$	0.58	69

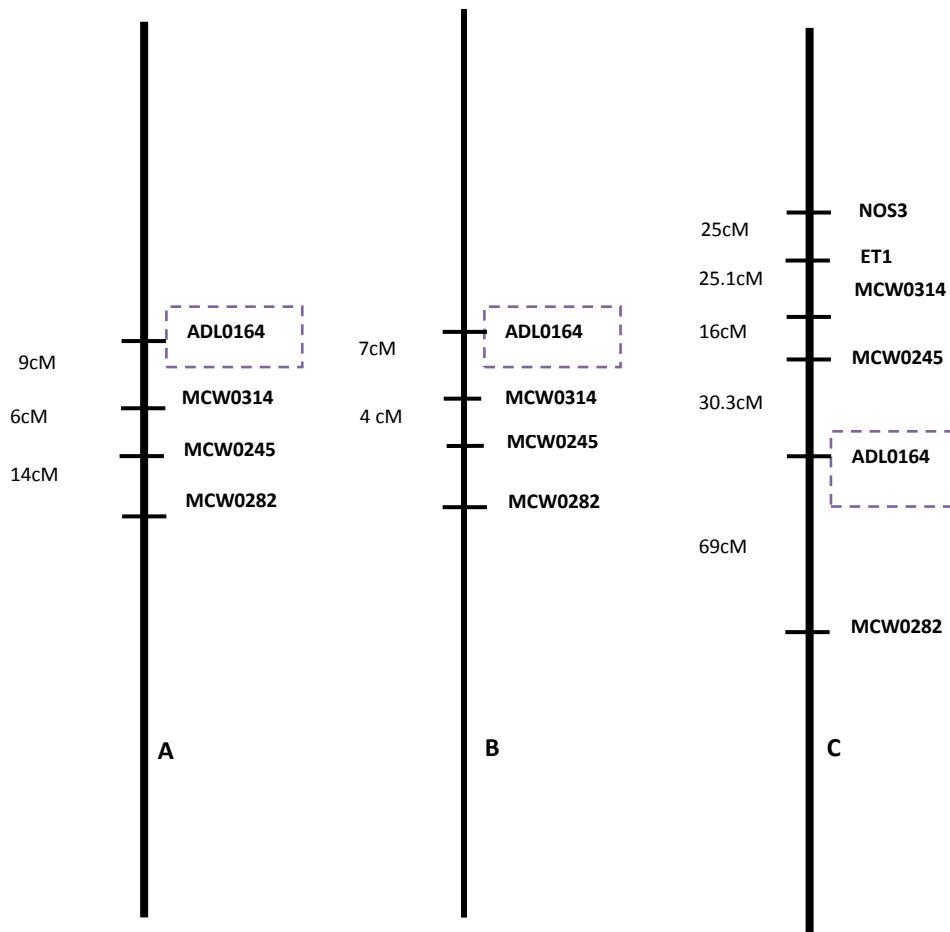
Figura 3-2. Esquema Mapa de ligamiento sobre GGA2q. Se resalta la ubicación de los genes *NOS3* y *ET1*.  $\theta$ : 24%  $Lod > 6,44$ . Los microsatélites son reportados por Rabie (2004). Longitud total del mapa 165.9 cM.



Al comparar el mapa con los reportados en literatura, es evidente un cambio en la posición del microsatélites ADL0164 en el GGA2q (figura 4-2).

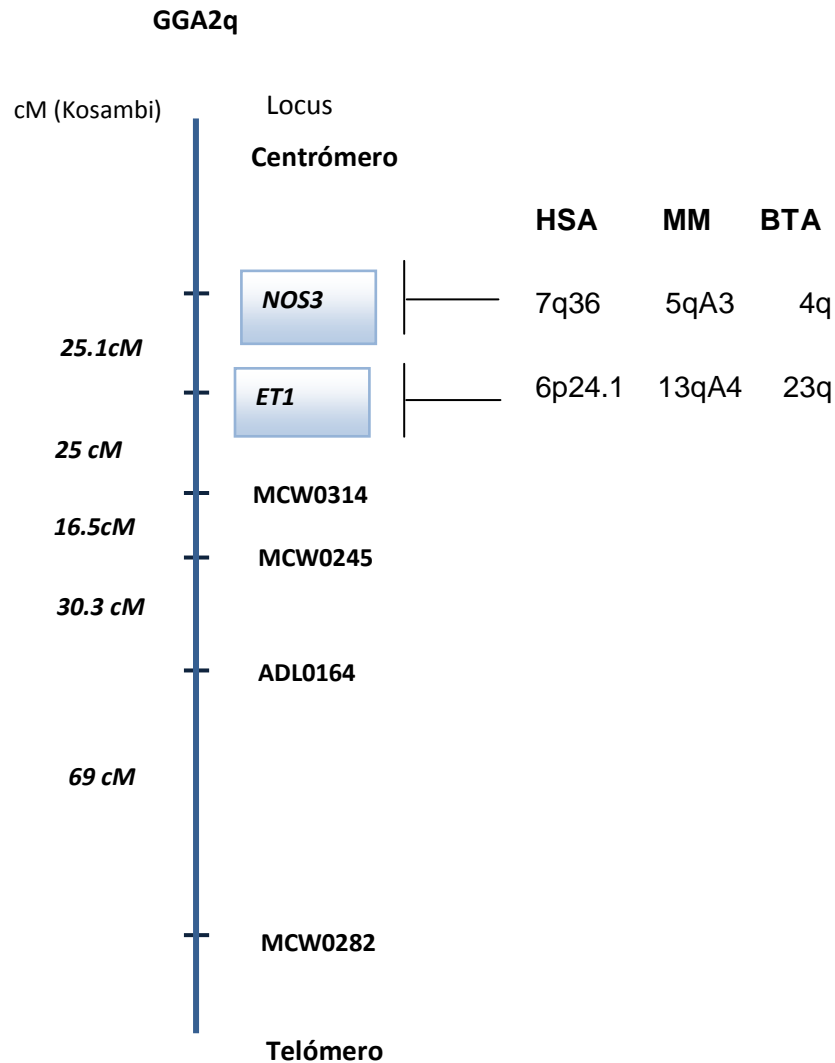
**Figura 4-2. Esquemas de Mapas de ligamiento sobre el GGA2q.**

Se compara el orden de los marcadores utilizados en la construcción del mapa de ligamiento y mapas reportados en literatura. **A:** Mapa de ligamiento reportado por Groenen *et al.*, (2000) distancias en Haldane cM. **B:** Mapa de ligamiento reportado por Rabie (2004) distancias en Haldane cM y **C:** Mapa de ligamiento plasmado en este trabajo, distancias en Kosambi cM. Se resalta la posición del microsatélite ADL0164 en los mapas referenciados vs el mapa construido en este trabajo empleando programa MAPMAKER/EXP versión 3.0 (Lincoln *et al.*, 1993).



También se ilustró la posición ortóloga de los genes *ET1* y *NOS3* en el humano, bovino y ratón (figura 5-2).

Figura 5-2. Localización ortóloga de los genes *NOS3* y *ET1* en Humanos (HSA), Ratones (MM) y Bovinos (BTA).



## 2.3 Discusión

Los mapas de ligamiento genético son herramientas esenciales para localizar loci que afectan rasgos económicamente importantes en producción animal (Groenen *et al.*, 1998). El mapa de ligamiento genético construido en este trabajo es un paso para lograr la ubicación sobre el GGA2q de genes que controlan la susceptibilidad de los pollos de engorde a desarrollar hipertensión pulmonar a



grandes alturas: *NOS3* y *ET1*, intrínsecos en un QLT asociado a tres características relacionadas con el síndrome como son índice cardiaco, peso ventricular derecho y peso ventricular total (Rabie, 2004; Rabie *et al.*, 2005). Incluir marcadores tipo I en una región del GGA2q asociada al SHP, permite la identificación potencial de estos genes como candidatos para características cardiopulmonares asociadas con el síndrome en los pollos. Al comparar el mapa construido en este trabajo con los mapas de ligamiento referenciados por Rabie (2004), Groenen *et al.*, (2000), Schmid *et al.*, (2000) Dodgson (2003), Jacobsson *et al.*, (2004), es evidente un cambio en el orden del marcador ADL0164, que probablemente se deba a el número de animales y de microsatélites empleados en cada estudio (Groenen *et al.*, 1998). Según Sankoff *et al.*, es posible que cambios en la ubicación de los marcadores, se deban al error experimental en el orden de los genes en los mapas de ligamiento genético y FISH (hibridación fluorescente *in situ*) construidos para los pollos por el empleo de mapas humanos y de ratones para predecir el orden más probable de estos sobre los cromosomas del pollo (Schmid *et al.*, 2000). Sin embargo, con la relación de ligamiento genético entre los genes *NOS3*, *ET1* y los microsatélites, se establece por primera vez la ubicación cromosómica del gen *NOS3* sobre el GGA2q.

Estos dos genes se conservan en el humano, el ratón y el bovino. La posición ortóloga de *ET1* y *NOS3* en el humanos es sobre los cromosomas 6p24.1 (*Gen ID*: 1906) y 7q36 (*Gen ID*: 4846), en el bovinos se encuentran en los cromosomas 23q (*Gen ID*: 281137) y 4q (*Gen ID*: 287024) y en el ratón se localizan sobre los cromosomas 13qA4 (*Gen ID*: 13614) y 5qA3 (*Gen ID*: 18127), respectivamente; lo que indica la formación de bloques separados de conservación entre las aves y los mamíferos (Brown *et al.*, 2003). Con estos mapas comparativos también se han identificado 154 sintenias entre el pollo y el humano, de las cuales el 65% han sido definidas (Schmid *et al.*, 2000). Un hallazgo importante es la homología en composición química de los productos proteicos y función biológica de los genes conservados entre las dos especies (NCBI *Reference Sequence*: XP\_001236470.1: *Related Sequences*; NCBI *Reference Sequence*:

XP\_418943.2: *Related Sequences*), con lo que se podría utilizar a los pollos como organismos modelos para estudiar la fisiología y patología endotelial en humanos, integrando mutaciones en los genes candidatos para determinar su papel en el desarrollo de la hipertensión pulmonar y generar nuevos tratamientos farmacológicos y profilácticos en ambas especies. Pero es claro que la enfermedad es compleja y la interacción de factores ambientales y genéticos e interacción gen-gen, generan susceptibilidad en los vertebrados, así, la ubicación sobre el mismo cromosoma de genes como *ZFPM2*, *FOG* y *GATA6* involucrados en el desarrollo cardiaco de los pollos (Rabie, 2004), que no fueron evaluados en este estudio, podrían estar implicados en la susceptibilidad al síndrome. Otro punto importante del enriquecimiento de los mapas genéticos del pollo domestico, es la posibilidad que brindan para localizar genes o loci de importancia económica en otras especies menos estudiadas pero importantes para la industria avícola como la codorniz japonesa (Kayang *et al.*, 2006) y el Pato Pekin (Skinner *et al.*, 2009). Aunque en las últimas dos décadas, los mapas de desequilibrio de ligamiento (*DL: disequilibrium linkage*), has sido ampliamente empleados para localizar genes en el genoma, asociados con enfermedades genéticas complejas, con algunas limitaciones que aun se están superando, pero con la gran ventaja de trabajar con docenas o cientos de generaciones recombinantes (Jorde, 2000) y determinar el origen de una mutación (Jorde, 2000; Pritchard y Przeworski, 2001).

## 2.4 Referencias

- ALJANABI M. S., y MARTINEZ I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-techniques. *Nucleic acids research* 25(22):4692-4693.
- BURT D. W., WHITE S. J. 2007. Emergence of the chicken as a model organism: implications for agriculture and biology. *Poultry science*, 86:1460-1471.

BROWN R. A., HUBBARD S. J., TICLE C. y WILSON S. A. 2003. The chicken as a model for large-scale analysis of vertebrate gene function. *Nature* 4:87-98.

CARRE W., WANG X., POTER T. E., NYS Y., TANG J., BERNBERG E., MORGAN R., BURNSIDE J., AGGREY S. E., SIMON J., y COGBURN L. A. 2006. Chicken genomics resource: sequencing and annotation of 35,407 ESTs from single and multiple tissue cDNA libraries and CAP3 assembly of a chicken gene index. *Physiol Genomics* 25:514-524.

DODGSON J. B. 2003. Chicken genome sequence: a centennial gift to poultry genetics. *Cytogenet Genome Res* 102:291-296.

DONG Y., WANG X., ZHU H., TREIBER F. A., SNIEDER H. 2004. Endothelin-1 gene and progression of blood pressure and left ventricular mass: longitudinal findings in youth. 44(6). *Abstract*.

EMARA M. G., y KIM H. 2003. Genetic markers their application in poultry breeding. *Poultry Science* 82:952-957.

GOMEZ A. P.; MORENO A.; IGLESIAS P.; CORAL P.; HERNANDEZ A. 2007. Endothelin 1, its Endothelin type A receptor, connective tissue growth factor platelet growth factor and adrenomedullin expression in lungs of pulmonary hypertensive and nonhypertensive chickens. *Poultry Science* 86:909-916.

GÓMEZ R. A. P. 2008. Regulación de la expresión de la endotelina 1 y su receptor ETA y de la sintasa de óxido nítrico en pulmones de pollo de engorde sanos y con hipertensión arterial pulmonar por hipoxia hipobárica. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Doctorado en Ciencias-Salud Animal. Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, D.C.

GROENEN M. A. M., CHENG H. H., BUMSTEAD N., BENKEL B. F., ELWOOD BRILES W., BURKE T., BURT D. W., CRITTENDEN L. B., DODGSON J., HILLEL J., LAMONT S., PONCE de LEON A., SOLLER M., TAKAHOSHI H., y VIGNAL A.

2000. A consensus linkage map of the chicken genome. *Genome Research* 10:137-147.

HYNDMAN M., PARSONS H., VERMA S., BRIDGE J., EDWORTHY S., JONES C., LONN E., CHARBONNEAU F., ANDERSON T. 2002. The T-786 mutation in endothelial nitric oxide synthase is associated with hypertension. *Hypertension* 39:919-922.

INTERNATIONAL CHICKEN POLYMORPHISM MAP CONSORTIUM 2004. A genetic variation map for chicken with 2.8 million single-nucleotide polymorphisms. *Nature* 432:717-722.

JACOBSSON L., PARK H.-B., WAHLBERG P., JIANG S., SIEGEL P. B., y ANDERSSON L. 2004. Assignment of Fourteen Microsatellite Markers to the Chicken Linkage Map. *Poultry Science* 83:1825–1831.

JIN J. J., NAKURA J., YAMAMOTO M., TABARA Y., YAMAMOTO Y., IGASE M.; KOHARA K., MIK T. 2003. Association of endothelin-1 gene variant with hypertension. *Hypertension* 41(1) *Abstract*.

JORDE L. B. 2000. Linkage disequilibrium and the search for complex disease genes. *Genome Research* 10:1435-1444.

KAYANG B. B., FILLON V., INOUE-MURAYAMA M., MIWA M., LEROUX S., FÉVE K., MONVOISIN J.-L., PITEL F., VIGNOLES M., MOUILHAYRAT C., BEAUMONT C., ITOS S., MINVIELLE F., y VIGNAL A. 2006. Integrated maps in quail (*Coturnix japonica*) confirm the high degree of synteny conservation with chicken (*Gallus gallus*) despite 35 million years of divergence. *BMC Genomics* 7:101-119.

LEVIN I., SANTANGELO H., CHENG L. B., CRITTENDEN y DODGSON J. B. 1994. An autosomal genetic linkage map of the chicken. *Journal of Heredity* 85:79-85.

LINCOLN S. E., DALY M. J., y LANDER. 1993. Constructing genetic linkage maps with MAPMAKER/EXP version 3.0: A tutorial and reference manual. A Whitehead Institute for Biomedical Research Technical Report. Third Edition, January, 49 pg.

PRITCHARD J. K. y PRZEWORSKI M. 2001. Linkage disequilibrium in humans: models and data. *American Journal Human Genetics* 69:1-14.

RABIE T. 2004. Pulmonary hypertension syndrome in chicken: peeking under QTL peaks. Doctoral thesis. Wageningen University, The Netherlands. 168 p.

RABIE T. S., CROOIJMANS R. P., BOVENHUIS H., VEREIJKEN A. L., VEENENDAAL T., VAN DER POEL J. J., VAN ARENDONK J. A.; PAKDEL A., y GROENEN M. A. 2005. Genetic mapping of quantitative trait loci affecting susceptibility in chicken to develop pulmonary hipertensión syndrome. *Animal Genetic* 36:468-476.

SCHMID M., NANDA I., GUTTENBACH M., STEINLEIN C., HOEHN H., SCHARTL M., HAAF T., WEIGEND S., FRIES R., BUERSTEDDE J-M., WIMMERS K., BURT D. W., SMITH J., A'HARA S., LAW A., GRIFFIN D. K.; *et al.* 2000. First report on chicken genes and chromosomes 2000. *Cytogenet Cell Genet* 90:169-218.

SCHEFFIELD V. C., BECK J. S., KWITEK A. E., SANDSTROM D. W., y STONE E. M. 1993. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 16:325-332.

SKINNER<sup>1</sup> B. M., ROBERTSON L. B.W., TEMPEST H., G., LANGLEY E. J., IOANNOU D., KATIE E FOWLER K. E., CROOIJMANS R. P.M.A., HALL A. D., GRIFFIN D., y VÖLKER M. 2009. Comparative genomics in chicken and Pekin duck using FISH mapping and microarray analysis. *BMC Genomics* 2009, 10:357-368.

TAYLOR G. R. 1997. Laboratory methods for the detection of mutations and polymorphisms in AND. CRC Press. New York, 317 pg.

WANG J., WANG X., XIANG R., y SUN W. 2002. Effect of L-NAME on pulmonary arterial pressure, plasma nitric oxide and pulmonary hypertension syndrome morbidity in broilers. *British Poultry Science* 43:615-620.

WOMACK J. E. 1990. Mapping the genomes of agriculturally important animals. Report of a Meeting Sponsored by The Institute of Biosciences and Technology, Texas A&M University, 178pg.

## **3. Capítulo 3 Asociación de polimorfismos de los genes *ET-1*, *NOS3* y *HIF1 $\alpha$* con la susceptibilidad de los pollos de engorde a desarrollar el síndrome de hipertensión pulmonar en grandes alturas**

### **3.1 Introducción**

Factores ambientales como bajas temperaturas (ejemplo 16°C o menos) (Mejía, 1982; Pan *et al.*, 2005; Druyan *et al.*, 2008) e hipoxia natural (Hernandez y Useche, 1991; Druyan *et al.*, 2008) son causas conocidas del SHP o ascitis en pollos de engorde, causando mortalidad hasta del 30% (Closter *et al.*, 2009). La producción mundial de pollos es de 40 billones anuales y las pérdidas por el síndrome para la industria avícola son significativas. En estudios recientes se ha identificado una asociación entre los niveles de RNAm de los genes *ET-1* (Gomes *et al.*, 2007), *eNOS* (Gómez, 2008) y *HIF1 $\alpha$*  (Catron *et al.*, 2001; Areiza, 2010) en pulmones de pollos de engorde y el desarrollo del SHP en grandes alturas.

#### **3.1.1 *ET-1***

Bajo condiciones de hipoxia crónica, las células endoteliales de los vasos pulmonares incrementan la expresión de *ET-1* por la unión en *cis* del HIF1 $\alpha$  (Semenza, 2004). En pacientes humanos, estudios de asociación sugieren que el riesgo de desarrollar hipertensión pulmonar aumenta si estos poseen el polimorfismo G/T en el codón 198 del exón 5 en el gen *ET-1*, que sustituye el aminoácido *Lys* por *Asn* en la proteína (Jin *et al.*, 2003). Esta variación también

ha sido asociada con el índice de masa corporal, sugiriendo que este polimorfismo contribuye con la patogénesis de la hipertensión en pacientes con sobrepeso (Dong *et al.*, 2004).

### 3.1.2 NOS3

En humanos, el gen *NOS3* es de expresión constitutiva, no posee la típica caja TATA en el promotor, en su lugar posee múltiples secuencias de regulación en *cis* como motivos GATA, elementos de respuesta a la hipoxia, elementos de respuesta al estrés por calor, elementos NF-1, cajas CCAT y CACCC, sitios AP-1 y AP-2 y una región de unión para p53 (Searles, 2006). Los polimorfismos hallados en el promotor (Wang y Wang, 2000), en el exón 7, intrón 18 y 23 (Miyamoto *et al.*, 1998; Hyndman *et al.*, 2002) han sido asociados con hipertensión e infarto del miocardio. Pero un polimorfismo de 27 nucleótidos hallado en el intrón 4 del gen ha sido motivo de estudio desde que se descubrió la existencia biológica de un microRNA derivado de esa repetición en el intrón, que en las células endoteliales baja la tasa de transcripción del gen en un 63% (Zhang *et al.*, 2005). También se descubrió que esta repetición actúa como un potenciador (*enhancer*) intrínseco en el intrón 4, al que se une la  $\beta$ -actina nuclear que actúa como factor de transcripción y afecta la expresión de eNOS (Searles, 2006). El óxido nítrico (ON) producido por la eNOS contribuye con la regulación del flujo sanguíneo, particularmente del flujo coronario y es la de mayor expresión en las vías respiratorias altas (Wang y Wang, 2000). Inhibe la agregación plaquetaria, expresión de moléculas de adhesión (Jaramillo, 2010) y regula la apoptosis (Tan, *et al.*, 2007). Pero la bioactividad del ON en la pared de los vasos depende de la expresión del gen eNOS, de la presencia de cofactores y sustratos para eNOS, del estado de fosforilación de la enzima y la presencia de especies reactivas de oxígeno que inactivan el ON (Searles, 2006). Cualquier alteración en la ruta de síntesis de ON produce hipertensión pulmonar en los pollos de engorde (Tan *et al.*, 2007) y en los humanos (Wang *et al.*, 2002). Las evidencias clínicas y estudios en organismos modelo sugieren una relación entre la disminución en la



producción de ON y la disminución en los niveles de la eNOS en plasma, asociados con el polimorfismo del intrón 4, lo que desencadena una inadecuada vasodilatación, aumento en la presión sanguínea, remodelación vascular e infarto del miocardio (Jemaa *et al.*, 2009).

### **3.1.3 HIF1 $\alpha$**

El factor de transcripción HIF1 $\alpha$  está formado por 2 hélices alfa unidas por una lámina beta (basic helix-loop-helix: bHLH) y dominios PAS que median la dimerización de la proteína y su unión a elementos de respuesta a la hipoxia. Posee un dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODDD) y dos dominios de transactivación en N-terminal (NAD) y C-terminal (CAD) (Kaluz *et al.*, 2008). Bajo condiciones de hipoxia, la respuesta molecular de los vertebrados, es inhibir la degradación del factor HIF1 $\alpha$  y permitir su transporte desde el citoplasma hasta el núcleo de las células por medio del receptor HIF1 $\beta$ , su acumulación y posterior unión a los HRE de genes blanco como *ET-1* (Kakinuma *et al.*, 2000), *EPO* (Semenza, 2004), Transportador de metales bivalentes 1 (*DMT1*) (Li *et al.*, 2008), Factor de crecimiento del endotelio vascular (*VEGF*) (Kaluz *et al.*, 2008) y *NOS3* (Searles, 2006). La respuesta es hiperventilación, vasoconstricción localizada, aumento en la absorción de hierro, remodelación vascular, policitemia, aumento de la presión de la arteria pulmonar y del gasto cardiaco. Pero estos signos deben disminuir gradualmente cuando los individuos se han adaptado (Stroka *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2008). Sin embargo, la respuesta puede tornarse patológica y causar enfermedad cardiovascular e hipertensión pulmonar (Brüne y Zhou, 2003). Se ha demostrado que la deficiente actividad del gen mutado (*HIF1*  $\alpha^{+/-}$ ) causa policitemia significativa, hipertrofia ventricular derecha, remodelación vascular, aumento en el número de vasos completamente muscularizados, despolarización de las células musculares lisas, vasoconstricción, hipertrofia de las mismas y cuerpos carotídeos con baja actividad nerviosa (Stroka *et al.*, 2001; Semenza, 2004; Mazure *et al.*, 2004; Kaluz *et al.*, 2008). También, se ha reportado una asociación

con malformaciones cardíacas (Catron *et al.*, 2001; Compernelle *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2004).

En los pollos de engorde se ha determinado que a grandes alturas desarrollan hiperventilación (Faraci, 1986), aumentan la concentración de hemoglobina y valor del hematocrito (Cárdenas *et al.*, 1985), desarrollan hipertrofia cardíaca derecha e incrementan la presión arterial pulmonar (Moreno de Sandino, 2004; Gómez, 2008). Estos mecanismos parecen estar relacionados con una predisposición genética para desarrollar el SHP, debido a que en estudios previos, se ha indicado la existencia de una correlación genética positiva entre la mortalidad y el hematocrito de los pollos de rápido crecimiento (Pakdel *et al.*, 2005) y una asociación entre la deficiente actividad de la enzima eNOS en el endotelio pulmonar de pollos enfermos (Moreno de Sandino, 2004).

Recientemente, los niveles de RNAm de los genes *ET-1* (Gomez *et al.*, 2007), *eNOS*, (Gómez, 2008) y del *HIF-1 $\alpha$*  (Catron *et al.*, 2001; Areiza, 2010) han sido relacionados con el síndrome de hipertensión pulmonar en pollos expuestos a hipoxia natural.

En la búsqueda de un posible origen genético del SHP, el objetivo que se planteó en el presente trabajo fue identificar polimorfismos de nucleótido simple funcionales en los genes candidatos *ET-1*, *NOS3* y *HIF-1 $\alpha$*  con el fin de asociarlos con la susceptibilidad del pollo de engorde a desarrollar el Síndrome de Hipertensión Pulmonar en grandes alturas.

## 3.2 Materiales y métodos

### 3.2.1 Población de estudio

Se utilizaron 161 machos F2 de un cruce *White Rocks* x *Vantress*. Para la identificación de las aves susceptibles al síndrome, se alojaron desde el día uno

hasta el día 49 en un galpón experimental del Edificio Avícola, propiedad de la Universidad Nacional de Colombia, ubicado a una altura aproximada de 2.638 msnm (presión barométrica = 560 mm Hg) en la ciudad de Bogotá, Colombia. Las condiciones de alojamiento y alimentación fueron las sugeridas por los manuales de procedimientos para la línea comercial, la temperatura se manejó de manera tradicional, similar a las explotaciones comerciales de pollos de engorde entre 20 y 18°C a través de un sistema programable y automático. El plan sanitario de vacunación llevado a cabo fue el establecido por el ICA: Gumboro al día 4, Enfermedad de New Castle (cepa B1) y Bronquitis infecciosa (cepa Massachussets) día 8, revacunándose contra la enfermedad de New Castle al día 18.

### **3.2.2 Sacrificio y toma de muestras**

El sacrificio de los pollos se realizó en la línea de sacrificio para pollos en la planta de procesos ICTA, propiedad de la Universidad Nacional de Colombia (previa aprobación de los procesos por parte del comité de bioética de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional, sede Bogotá). Previo al sacrificio, los animales fueron identificados individualmente mediante marcación adherida al fémur. Antes de la evisceración se realizó la inspección de sacos aéreos y pulmones, con el fin de descartar animales con cualquier tipo de lesión visible en estos órganos. Posteriormente, empleando tijeras y pinzas quirúrgicas, se extrajo el corazón, que se depositó en un frasco con formaldehído al 10 %. Cada frasco se rotuló con la fecha del día de toma de muestra, la identificación del ave y el contenido del frasco. Mediante el mismo método se tomaron muestras de hígado y de músculo para extracción de ADN genómico que se depositaron por separado en tubos eppendorf rotulados con el tipo de tejido, fecha, número del animal y se almacenaron a -70°C.

### 3.2.3 Determinación del Índice cardiaco

El criterio de selección de aves sanas y enfermas fue el Índice Cardiaco (IC), definido como el indicador de ascitis en pollos de engorde (Closter *et al.*, 2009); el cual fue calculado así: peso del ventrículo derecho (PVD) dividido por la masa ventricular total (PVT) x 100. Para considerar animales enfermos se estableció un IC > 25 y aves sanas con IC < 22 (Hernández, 1987; Moreno de Sandino y Hernández, 2003).

### 3.2.4 Extracción de ADN genómico

La extracción se realizó a partir de tejido congelado según el protocolo *salt-extraction* descrito por Aljanabi y Martínez (1997).

La concentración y pureza del ADN se evaluó en fluorómetro marca iQuib© de acuerdo a las instrucciones de manufactura (Invitrogen™, USA). La visualización se realizó en geles de agarosa al 0.8%, teñidos con SYRBgreen® (Invitrogen™, USA). La concentración final de trabajo fue 10 ng/ul ADN en buffer TE 0.1X.

El ADN y las muestras adicionales de tejido, se rotularon con el número de identificación de cada individuo, se depositaron en cajas plásticas marcadas con el nombre del proyecto, la fecha de extracción y el responsable de las muestras. Finalmente se almacenaron a -4°C y -20°C respectivamente.

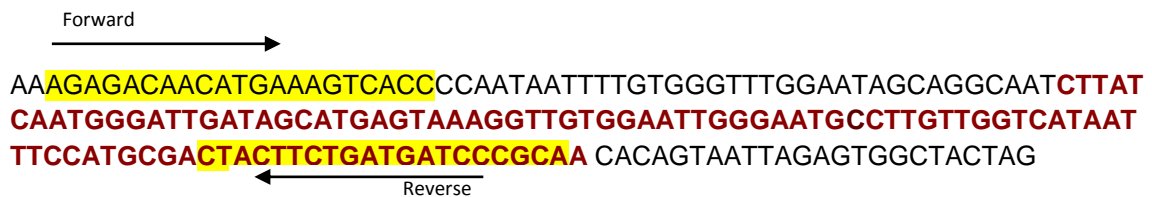
### 3.2.5 Diseño de iniciadores

Cada juego de iniciadores para amplificar los segmentos seleccionados se diseñaron a partir de la información almacenada en el GenBank: *ET-1* (Gene ID: 420854), *NOS3* (Gene ID: 776984) y *HIF-1 $\alpha$*  (Gen ID: 374177) empleando el software libre PRIMER3

([http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)), y sintetizados por XX IDT Integrated DNA Technologies. Ver figuras 6-3, 7-3 y 8-3.

**Figura 6-3. Posición de los iniciadores en el intrón 3 del gen *ET1*.**

Resaltado en amarillo: iniciadores, rojo: fragmento del intrón 3 amplificado, Fuente: [http://www.ensembl.org/Gallus\\_gallus/Gene/Summary?db=core;g=ENSGALG00000012735;r=2:63816357-63819872;t=ENSGALT00000020785](http://www.ensembl.org/Gallus_gallus/Gene/Summary?db=core;g=ENSGALG00000012735;r=2:63816357-63819872;t=ENSGALT00000020785).



**Figura 7-3. Posición de los iniciadores entre los exones 1 y 2 del gen *NOS3*.**

Resaltado en amarillo: iniciadores, rojo: intrón 1, azul: exones 1 y 2, texto resaltado en gris: fragmento amplificado. Fuente: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/118128685?report=graph>



**Figura 8-3. Posición de los iniciadores en el intron 6 del gen *HIF1 $\alpha$* .**

Resaltado en amarillo: iniciadores, rojo: fragmento del intrón 6 amplificado. Fuente: [http://www.ensembl.org/Gallus\\_gallus/Gene/Summary?g=ENSGALG00000011870;r=5:56522431-56553605](http://www.ensembl.org/Gallus_gallus/Gene/Summary?g=ENSGALG00000011870;r=5:56522431-56553605)



### 3.2.6 Amplificación

Los segmentos se amplificaron por PCR convencional en un volumen total de 12.5  $\mu$ l. Las reacciones se obtuvieron a partir de GoTaq  $\text{\textcircled{R}}$ Green Maxter Mix 2x (Promega; USA); 8 pmol de cada iniciador Forward y Reverse; 1.7  $\mu$ l de agua miliQ y 50ng ADN. Las amplificaciones se realizaron empleando un ciclo inicial de 95°C x 3 minutos, 30 ciclos a 95°C x 30 segundos, 54 a 60°C x 60 segundos, 72°C x 90 segundos y finalmente un ciclo a 72°C x 10 minutos. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa a 1.5%, teñidos con 3  $\mu$ l de SYRBgreen $\text{\textcircled{R}}$  (Invitrogen $\text{\textsuperscript{TM}}$ , USA), posteriormente los genotipos fueron evaluados en geles de poliacrilamida (tabla 9-3).

Tabla 9-3. Detalle de las características de amplificación

Gen	Primer forward 5'-3'	Primer reverse 5'-3'	Longitud en pb	GenID	Temperatura de anillamiento
ET1	AGAGACAACATGAAAGTCACC	TGCGGGATCATCAGAAGTAG	150	420854	56
NOS3	CTCGAGGACCAGCTCTGAAG	ATCTGGAACACGCAGCTGAT	286	776984	57.3
HIF1 $\alpha$	TCATCAGAAATGACTTCTGGC	TGGTGGATGTATGAAAGCAATC	164	374177	59

### 3.2.7 Detección de los SNPs

Para descubrir los SNPs en los fragmentos amplificados se empleó la técnica SSCP (*single strand conformation polymorphism*) (Scheffield *et al.*, 1993; Taylor, 1997).

- **Siembra y condiciones de los geles:** A los amplificados se le agregaron 10  $\mu$ l de buffer de carga (98% de formamida, 10mM EDTA y 0.2% de Bromo fenol); se

desnaturaron a 95 °C por cinco minutos y se colocaron en hielo durante 5 minutos. 15  $\mu$ l de cada muestra se sembraron en geles no denurantes de poliacrilamida 6x - 5% de glicerol, elaborados a partir de una solución madre de Acrilamida:Bis-Acrilamida 40x (ver detalle en la tabla 10-3) utilizando buffer TBE 1X para la corrida.

**Tabla 10-3. Condiciones de los geles no denurantes para técnica SSCP**

Gen	Gel	Tiempo de corrido	Temperatura de corrido	váticos
ET1	49:1	15 horas	4°C	8
HIF1 $\alpha$	89:1	8.40horas	Ambiente	25
NOS3	29:1	13 horas	Ambiente	8

### 3.2.8 Revelado de los geles y lectura de genotipos

Para el revelado se empleo el protocolo con nitrato de plata sugerido por Taylor (1997). En el último paso del revelado, cumplidos los 20 minutos, cada gel fue despegado del vidrio con el fin de pasarlo a otro previamente protegido con papel celofán frío humedecido con agua corriente. La cara desprovista se cubrió con un trozo de igual tamaño también humedecido. Se retiraron los excesos de agua y los geles se dejaron secar por 12 horas. Luego, los genotipos fueron leídos y registrados en una base de datos después de ser confirmados por dos lectores diferentes al lector inicial, asignado un número a cada alelo visualizado.

### 3.2.9 Análisis estadístico

El concepto genético de SHP es enfermedad compleja. Donde la interacción entre factores ambientales y múltiples genes se asocian para generar susceptibilidad

(Sevilla, 2007). Comprender dicha interacción y lograr la asociación con el fenotipo de interés, requiere de una metodología en donde la disminución en la disponibilidad de oxígeno y la estructura genética de los individuos en estudio puedan ser asociados. Los estudios de asociación genética buscan establecer el peso relativo del componente genético con respecto a otros factores como el ambiente en el riesgo de desarrollar enfermedad (Sevilla, 2007; Wyszynki, 1998). En estos estudios se utilizan los SNPs que desde el punto de vista estadístico constituyen una variante categórica con varios genotipos posibles y se suele considerar como categórica de referencia al grupo de individuos homocigotos para el alelo más frecuente. Para evaluar la asociación del polimorfismo con la enfermedad se constituye la tabla de contingencia correspondiente y se puede contrastar la hipótesis de asociación o de independencia (Iniesta *et al.*, 2005; Wyszynki, 1998). En este trabajo para considerar la asociación entre los SNPs y el SHP, se utilizó un diseño casos-controles basados en individuos no emparentados y se empleó el programa estadístico libre en la web Lamp-0.0.9, que estima la asociación calculando el Lod score de cada genotipo respecto al alelo de referencia para cuantificar la magnitud de la asociación con significancia estadística de  $p < 0.001$ , además de la penetrancia o proporción de individuos que con determinado genotipo presentaron un cierto fenotipo (Boehnke y Abecasis, 2006).

### **3.2.10 Secuenciamiento**

La secuenciación de los productos de cada gen candidato se restringió a individuos enfermos con ciertos patrones de bandas observadas en los geles siguiendo argumentos de Scheffield *et al.*, (1993). Estos productos denominados heterocigotos y homocigotos fueron enviados a un servicio externo de secuenciación. El análisis de las secuencias se llevo a cabo empleando los programas libres en la web ClustalX 2.0.12 (<http://mac.softpedia.com/get/Math-Scientific/ClustalX.shtml>) y phred versión 0.020425 (Ewing *et al.*, 1998).



## 3.3 Resultados

### 3.3.1 Índice cardiaco

Los índices cardiacos hallados en los 161 pollos evaluados variaron entre 11,28 como valor mínimo de IC y 54 como valor máximo de IC. Los datos fueron usados como criterio de selección para establecer aves sanas (controles) y enfermas (casos) (ver tabla 11-3).

Tabla 11-3. Frecuencia de aves sanas y enfermas

Aves	Valor de IC*	N° individuos	Frecuencia
Sanas	<22%	60	37%
Enfermas	>25%	101	63%

\*Valores de IC tomados como criterios de selección según Hernández, 1987; Moreno de Sandino y Hernández, 2003.

### 3.3.2 Análisis de asociación genética

Los genotipos identificados junto con los índices cardiacos, se utilizaron para ordenar la base de datos del programa Lamp-0.09. Donde los animales enfermos se denominaron 2 y los sanos 1, los parentales 0, sexo 1, (ver figura 9-3).

Figura 9-3 Archivo de entrada Lamp-0.09.

1° columna: N° de animales, 2° columna ID del animal, 3° y 4° parentales, 5° sexo, 6° y 7° genotipos *ET-1* y *NOS3*, 8° IC, 9° Código sanos (1) y enfermos (2).

N° de animales	ID del animal	3° parentales	4° parentales	5° sexo	6° y 7° genotipos ET-1 y NOS3	8° IC	9° Código sanos (1) y enfermos (2)
1	2	0	0	1	1 1	1 1	19.27 1
2	3	0	0	1	1 1	1 2	44.29 2
3	5	0	0	1	2 3	1 2	33.03 2
4	6	0	0	1	1 2	1 1	17.38 1
5	9	0	0	1	2 2	1 2	34.47 2
6	10	0	0	1	1 2	1 2	27.23 2
7	11	0	0	1	1 1	1 1	23.22 1
8	13	0	0	1	1 2	1 3	27.31 2
9	14	0	0	1	1 2	1 2	25.45 2
10	16	0	0	1	1 2	1 2	33.97 2
11	17	0	0	1	1 1	1 2	25.97 2
12	19	0	0	1	1 2	1 2	16.42 1
13	20	0	0	1	1 3	1 3	20.32 1
14	22	0	0	1	1 1	2 2	17.08 1
15	26	0	0	1	1 3	1 3	15.58 1
16	27	0	0	1	1 1	1 2	27.67 2
17	31	0	0	1	1 1	2 3	12.34 1
18	33	0	0	1	1 3	1 2	42.11 2
19	35	0	0	1	1 1	1 2	30.19 2
20	36	0	0	1	1 3	1 2	14.08 1
21	38	0	0	1	1 1	1 1	21.67 1
22	41	0	0	1	1 1	1 1	42.39 2
23	50	0	0	1	1 1	1 1	48.48 2
24	54	0	0	1	1 3	1 1	37.5 2
25	62	0	0	1	1 2	1 1	26.24 2
26	65	0	0	1	2 2	1 3	17.08 1
27	66	0	0	1	1 3	1 3	12.62 1
28	69	0	0	1	1 2	1 1	16.84 1
29	73	0	0	1	1 1	1 1	21.36 1
30	74	0	0	1	1 2	1 2	19.25 1
31	75	0	0	1	1 2	1 2	20.44 1
32	76	0	0	1	1 1	1 2	27.61 2
33	80	0	0	1	2 3	1 2	14.55 1
34	81	0	0	1	2 3	x x	11.78 1
35	7	0	0	1	1 2	1 2	35.47 2
36	8	0	0	1	1 2	1 2	16.02 1
37	12	0	0	1	1 1	1 2	46.29 2
38	24	0	0	1	1 1	x x	17.57 1
39	28	0	0	1	1 3	1 1	29.27 2
40	29	0	0	1	1 2	1 2	27.88 2

La ejecución del programa Lamp-0.09, mostro: i) Los alelos de referencia, los cuales son 1, 2 y 3 para los genes *ET-1* y *NOS3*. Y 1 para el gen *HIF1 $\alpha$* . ii) El lod, valor de  $p$ , los grados de libertad y la frecuencia en la población para prueba de hipótesis, la cual es: existe asociación entre los genotipos y la enfermedad, que resulta significativa para la combinación 1 / 2 en el gen *NOS3* e *HIF1 $\alpha$*  (lod > 6 y  $p < 0.001$ ) y se rechaza para el resto, incluidos los genotipos hallados en *ET-1* (lod < 6 y  $p > 0.001$ ) y iii) Penetrancia del alelo, la cual es mayor en los animales heterocigotos que en los homocigotos, situación que se conserva en los tres genes evaluados ( ver tablas 12-3 y 13-3).

Las aves control (37%) que se genotificaron con los alelos de referencia se definen como genotipos con penetrancia incompleta.

**Tabla 12-3 Prueba de asociación genética para los genes ET-1 y NOS3**

Loci	Rasgo	Alelo de referencia	LOD	gl	Valor de p	Frecuencia	Penetrancia en genotipos		
							1/1	1/2	1/3
ET1	enfermo	1	1.71	2	0.020	0.625	0.046	0.062	0.022
		2	0.18	2	0.66	0.621	0.033	0.043	0.055
		3	1.60	2	0.025	0.647	0.000	0.065	0.046
NOS3	enfermo	1	6.92	2	1.2e-007	0.688	0.029	0.083	0.006
		2	2.73	2	0.0019	0.681	0.000	0.080	0.040
		3	0.95	2	0.112	0.654	0.000	0.059	0.048

Pico de asociación LOD = 6.919 (2 df) de NOS3 para enfermedad

**Tabla 13-3 Prueba de asociación genética para el gen HIF1 $\alpha$**

Loci	Rasgo	Alelo de referencia	LOD	gl	Valor de p	Frecuencia	Penetrancia fijada		
							1/1	1/2	2/2
HIF1A	enfermo	1	13.13	2	7.5e-014	0.572	0.026	0.085	0.000

Pico de asociación LOD = 13.127 (2 df) de HIF1A para enfermedad

### 3.3.3 Análisis de secuencias

#### ▪ *ET-1*

En los animales que se secuenciaron se hallaron tres alelos dentro el fragmento de 150 pb, los cuales se identificaron como inserción de una C, inserción de una A y un cambio de C/T (tablas 14-3, 20-3 y figura 10-3). La frecuencia de los alelos en la población control y enferma se muestran en la tabla 15-3.

Tabla 14-3. Polimorfismos identificados en el intrón 3 del gen *ET-1*

Alelo	Polimorfismo	Ubicación en pb	*Código IUPAC	Naturaleza
1	C / T	63818844	Y	SNP
2	- / C	63818805-63818806		Inserción
3	- / A	63818835-63818836		Inserción

\*International Union for Pure and Applied chemistry

Figura 10-3. Estructura del Gen *ET-1*.

Polimorfismos identificados en la secuencia amplificada del intrón 3. Rojo: inserción de C (-/C), inserción de A (-/A), cambio C/T (Y).

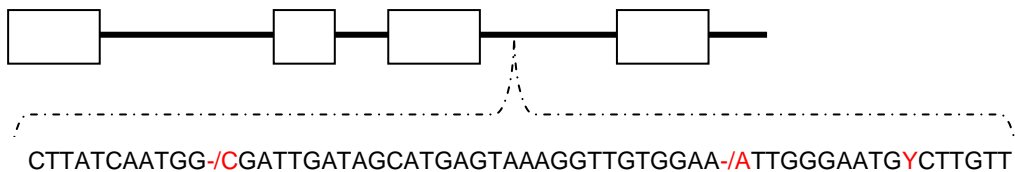


Tabla 15-3. Frecuencia alélica para el gen *ET-1* en la población de estudio

Polimorfismo	Frecuencia en pollos sanos	Frecuencia en pollos con SHP
C/T	0,212	0,362
-/C	0,096	0,123
-/A	0,073	0,135

▪ **NOS3**

En el fragmento amplificado de 286 pb del gen NOS3 se identificó en la hebra negativa una secuencia consenso de respuesta a la hipoxia 3'[ACGTG]5' y una caja CACCC en sentido 5'-3' ubicadas en el intrón 1 del gen. Los polimorfismos identificados como un cambio de C>A/T, G>T/A, y T/A, se descubrieron dentro de la secuencia consenso 3'[ACGTG]5' (ver tabla 16-3, 20-3 y figura 11-3). En la tabla 17-3 se presenta la frecuencia de los alelos en la población evaluada.

Tabla 16-3. Polimorfismos identificados en el intrón 1 del gen NOS3

Alelos	Polimorfismo	Posición	Ubicación pb	*Código IUPAC	Naturaleza
1	C>A/T	Intrón 1	608	M	SNP
2	G>T/A	Intrón 1	607	K	SNP
3	T/A	Intrón 1	606	W	SNP

\*International Union for Pure and Applied chemistry

**Figura 11-3. Estructura del gen NOS3.**

Polimorfismos en la secuencia amplificada a partir del intrón 1. Azul: caja CACCC. Texto resaltada en gris: secuencia complementaria del elemento de respuesta a la hipoxia 3'[ACGTG]5' con los respectivos cambios descubiertos en rojo: C/A (M), G/T (K) e inserción de una T/A (W).

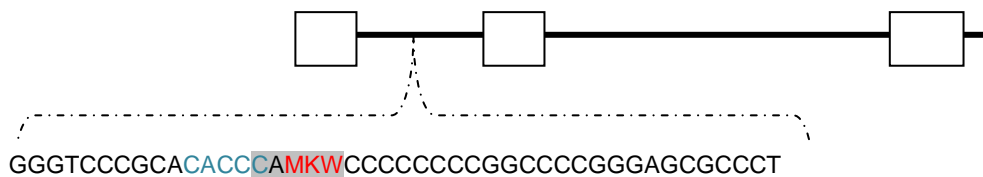


Tabla 17-3. Polimorfismos en la secuencia amplificada a partir del intrón 1 del gen *NOS3*.

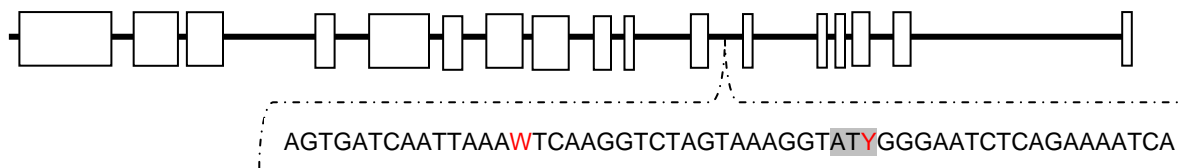
Polimorfismo	Frecuencia en pollos sanos	Frecuencia en pollos con SHP
C>A/T	0,1967	0,4098
G>T/A	0,0656	0,1598
T/A	0,0615	0,1066

### ▪ *HIF1 $\alpha$*

En la secuencia de 164 pb del intrón 6 del gen *HIF-1 $\alpha$* , se encontraron dos SNPs: uno que da origen a un codón TTA reconocido como un codón que señala el final de la transcripción: 5'YTA3' (figura 11-3) y el segundo en la base número 56540236. En la tabla 18-3 y 20-3 se exponen los detalles del hallazgo y en la tabla 19-3 la frecuencia alelica en la población de estudio.

Figura 12-3. Estructura del gen *HIF1 $\alpha$* .

Polimorfismos identificados en el intrón 6. Rojo: Polimorfismos identificados en la secuencia amplificada. Texto resaltado en gris: codón 3'TTA5' con un cambio de T/C (Y) y A/T (W).

Tabla 18-3. Polimorfismos identificados en el intrón 6 del gen *HIF1 $\alpha$* 

Alelos	Polimorfismo	Ubicación en pb	*Código IUPAC	Naturaleza
1	T / C	56540257	Y	SNP
2	A / T	56540236	W	SNP

\*International Union for Pure and Applied chemistry

**Tabla 19-3. Frecuencia de los alelos del gen *HIF1 $\alpha$*  en la población de estudio**

Polimorfismo	Frecuencia en pollos sanos	Frecuencia en pollos con SHP
T/C	0,1765	0,4588
A/T	0,1324	0,2324

En la tabla 20-3 se resumen los hallazgos de lectura de genotipos, IC y la naturaleza de los polimorfismos en los individuos enfermos seleccionados para secuenciar.

**Tabla 20-3 Consenso genotipos-secuencias-índices cardiacos**

ID	<i>ET-1</i>	<i>NOS3</i>	<i>HIF1<math>\alpha</math></i>	Secuencias <i>ET-1/NOS3/HIF1<math>\alpha</math></i>	IC
13	1 1	1 3	1 2	TT/TAA/T-C	27
51	2 2	1 2	1 2	CC/ATA/T-C	25
54	1 3	1 2	1 1	A-T/ATA/TT	54
17	1 1	1 2	1 2	TT/ATA/T-C	26
14	1 2	1 3	1 1	C-T/TAA/TT	24
55	1 2	1 2	1 2	C-T/ATA/T-C	34
56	2 2	1 3	1 2	CC/TAA/T-C	30
60	1 3	1 1	1 2	A-T/TTA/T-C	32

### 3.4 DISCUSIÓN

En estudios previos, los bajos niveles de RNAm del gene *NOS3* (Moreno de Sandino y Hernández, 2003; Gómez, 2008) e *HIF1 $\alpha$*  (Areiza, 2010) hallados en los pulmones de pollos de engorde expuestos a hipoxia natural, fueron asociados

con la susceptibilidad a desarrollar el síndrome de hipertensión pulmonar en grandes alturas. En el presente estudio se identificaron polimorfismos en los genes *NOS3* y *HIF1 $\alpha$* , que están significativamente asociados con la susceptibilidad de los pollos de engorde a desarrollar el SHP, por estar ubicados dentro de secuencias que comprometen los niveles de transcripción génica.

El análisis de estos polimorfismos permitió establecer que los genes candidatos *NOS3* y *HIF1 $\alpha$*  confieren susceptibilidad genética para presentar el SHP. De esta forma se cumple con el principal objetivo del estudio de asociación que fue comparar la frecuencia alélica de los diferentes genes candidatos en un grupo de individuos afectados por la enfermedad de interés y en un grupo control, expuestos a hipoxia natural crónica (Sevilla, 2007; Iniesta et al., 2005).

Los polimorfismos que se descubrieron en el gen *NOS3* se localizan en una secuencia consenso que corresponde a un HRE [ACGTG], siendo el alelo 1 identificado como el cambio de una C/A ó T en la base 608 del primer intrón, el de mayor presencia en la población enferma: 41% (tabla 17-3), que combinado con los alelos 2 y 3 (genotipos 1/2 y 1/3) aumentan la expresión del fenotipo enfermo en la población de estudio en más de un 80% (tabla 12-3). Esto puede deberse a que los HRE actúan como intensificadores de la transcripción (Searles, 2006) o sitio de regulación en *cis* a los que se unen factores de transcripción como el HIF1 $\alpha$  que se estabiliza en condiciones de hipoxia (Kaluz *et al.*, 2008). Este tipo de regulación en *trans* se da en situaciones específicas de adaptación de los organismos sometidos a condiciones de baja concentración de oxígeno aumentando la transcripción de ciertos genes constitutivos dependientes del estímulo ambiental (Caramelo et al., 2006). De acuerdo con lo mencionado, se asume que al encontrarse mutada esta secuencia y teniendo en cuenta la penetrancia en los genotipos 1/2 y 1/3, la regulación en *trans* no se lleva a cabo debido a que el HIF1 $\alpha$  no reconoce el sitio de unión al ADN, lo que no favorece la positiva transcripción del gen y se disminuyen los niveles de expresión del *eNOS*, como ha sido mencionado para los humanos (Searles, 2006) y ratones (Coulet et



al., 2003). Estos cambios podrían sugerirse como marcadores genéticos de la susceptibilidad a desarrollar el SHP de origen hipóxico, debido a que el nivel expresión de RNAm de eNOS se encuentra disminuido en los pollos enfermos a grandes alturas (Gómez, 2008; Tan *et al.*, 2007) y existe certeza de la poca actividad de la enzima en vasos pulmonares (Moreno de Sandino, 2004). Muchos estudios han puesto en evidencia que alteraciones en la ruta de síntesis de ON endotelial por la eNOS están involucradas en la disfunción endotelial en humanos (Jaramillo *et al.*, 2010), incrementan la predisposición a enfermedades cardiovasculares e hipertensión (Wang y Wang, 2000; Jamaa *et al.*, 2009; Jaramillo *et al.*, 2010), apoplejía y enfermedades renales (Wang y Wang, 2000), por disminución en los niveles de expresión del gen. La importancia de reportar por primera vez una secuencia consenso HRE en el intrón 1 del gen *NOS3* y dentro de ella dos polimorfismos que se asocian con el SHP, radica en la poca información que se tiene de la secuencia aviar en las bases de datos públicas, en las cuales la secuencia permanece incompleta, no se poseen registros sobre polimorfismos y su naturaleza. Sin embargo, utilizando la secuencia reportada en el GenBank, se produce esta nueva información, que además, sugiere el papel que los cambios tipo SNP desempeñan en la susceptibilidad de los pollos de engorde a desarrollar el SHP en grandes alturas, al disminuir la eficiencia de transcripción en condiciones de hipoxia crónica.

El factor de transcripción HIF1 $\alpha$  es producto de un corte y empalme alternativo (*Ensembl*: ENSGALG00000011870), uno de cada tres de estos eventos introduce codones de terminación prematura (*PTC: Premature Termination Codons*) (Wang y Cooper, 2007) o activa sitios críticos de corte y empalme alternativo (Pagani y Baralle, 2004) que generan enfermedad o susceptibilidad a enfermarse (Wang y Cooper, 2007; Baralle *et al.*, 2009). El genotipo 1/2 significativamente asociado (Lod: 13,12;  $p < 0.001$ ) con el desarrollo del SHP con una penetrancia del 85% en condiciones de hipoxia hipobárica natural crónica, podrían estar generando: a) Un codón de terminación prematuro de la subunidad alfa (UAG) o b) Activando un

sitio de corte y empalme alternativo críptico (AG) mediante una señal constituida por elementos *cis* para reconocer y regular el corte y empalme alternativo. En el corte y empalme alternativo, estas secuencias son reconocidas por pequeñas partículas nucleares conocidas como ribonucleoproteínas o snRNP (*small nuclear ribonucleoproteins*) que regulan la edición (Pagani y Baralle, 2004). En ambas circunstancias estos elementos de activación *cis*, localizados en los intrones, son elementos que controlan la estabilidad del mRNA, la eficiencia de la traducción y su localización (Wang y Cooper, 2007). Hun et al. (2003), Shohet y Garcia (2007) han reportado que cualquier alteración en la secuencia del gen para la subunidad alfa puede ocasionar fallas en la regulación de transcripción del factor y generar problemas en el desarrollo embrionario en pollos y en mamíferos, con un fuerte impacto en el desarrollo del órgano cardiaco. Areiza (2010) reporta que en pulmones de pollos sanos y enfermos, sometidos a hipoxia hipobárica natural, el nivel de RNAm esta disminuido. Una posible hipótesis que explica los hallazgo es que las aves sanas se adaptan fácilmente, como lo reportan Stroka *et al.*, (2001), Li *et al.*, (2008) y Smith *et al.*, (2008), mientras que las aves enfermas podrían ser susceptibles por la posible presencia de los cambios hallados en la secuencia del intrón 6 del gen, que como siguieren Wang y Cooper (2007), conllevan a una rápida degradación del factor HIF1 $\alpha$  en el citoplasma celular.

La falta de asociación entre la presentación del SHP y los alelos identificados en el gen *ET-1*, no significa que el gen no esté involucrado en la susceptibilidad de los pollos al síndrome, sino que se debe buscar en otras secciones del gen, polimorfismos que puedan estar alterando secuencias de *trans*-activación o elementos *cis*. La hipertensión pulmonar es una enfermedad de características compleja en la que la interacción de factores genéticos, epigenéticos y ambientales pueden estar jugando un papel importante y el gen *ET-1*, es uno de los genes candidatos que regula un mecanismo trascendental en la predisposición a desarrollar el síndrome en pollo y en humanos por los cual no se debe dejar de lado en futuras investigaciones.

Los hallazgos de esta investigación, permiten replantear el uso de secuencias intrónicas en la búsqueda de polimorfismos funcionales que generen cambios fisiológicos. Como es evidente en este trabajo, los intrones poseen secuencias reguladoras de la transcripción o señales de control post-transcripción (Mattick, 2010). Las modificaciones de estas secuencias conocidas como elementos de activación *cis* y *trans* pueden alterar los procesos fisiológicos de adaptación a la hipoxia, haciendo a los organismos, especialmente a las pollos de engorde más o menos susceptibles al SHP en grandes alturas.

Con respecto a las aves control (37%) que presentaron los genotipos de referencia pero que no fueron secuenciadas se asume: 1° Que aunque presentaron los patrones de bandas sugeridos por Scheffield *et al.*, (1993), es probable que estas alteraciones se encuentren en otras secciones del fragmento evaluado en los genes candidatos y no dentro de las regiones reguladoras como es el caso de los genes *HIF1 $\alpha$*  y *NOS3*, porque de acuerdo con los antecedentes, las aves sanas mantiene función y niveles de expresión normales, a diferencia de las aves enfermas (Moreno de Sandino y Hernández, 2003; Tan *et al.*, 2007; Gómez, 2008 y Areiza, 2010), razón por la cual se deciden secuenciar solo ciertos animales enfermos.

### 3.5 Referencias

ALJANABI M. S., y MARTINEZ I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-techniques. *Nucleic acids research* 25(22):4692-4693.

AREIZA R. R. A. 2010. Posible papel del grado de vascularización pulmonar en la resistencia/ susceptibilidad a la hipertensión pulmonar en una estirpe comercial de pollo de engorde. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Doctorado en Ciencias-Salud Animal. Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, D.C.

BALTAZARES L. M., RODRIGUEZ C. J., ORTEGA M. J., SOTRES V. A., BALTAZARES L. M. E. 2005. Sistema endotelina. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 18(4):308-320.

BARALLE D., LUCASSEN A., y BURATTI E. 2009. Missed threads. The impact of pre-mRNA splicing defects on clinical practice. *European Molecular Biology Organization reports* 10(8):810-816.

BOEHNKE LI y ABECASIS. 2006. Efficient study designs for test of genetic association using sibship data and unrelated cases and controls. *Am J Hum Genet* 78:778-92.

BRÜNE B., y ZHOU J. 2003. The role of nitric oxide (NO) in stability regulation of hipoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ). *Current Medicinal Chemistry* 10: 845-855.

CARDENAS D., HERNÁNDEZ A., y OSUNA O. 1985. Algunos valores de hematocrito y de proteínas totales en pollos Arbor Acres sanos y ascíticos en la sabanade Bogotá. *Rev. ACOVEZ* 9:42.

CATRON T., MENDIOLA M. A., SMITH S. M., BORN J., y WALKER M. K. 2001. Hypoxia regulates avian cardiac Arnt and HIF-1 $\alpha$  mRNA expression. *Biochemical and Biophysical Research communications* 282:602-607.

COMPERNOLLE V., BRUSSELMANS K., FRANCO D., MOORMAN A., DEWERCHIN M., COLLEN D., CARMELIET P. 2003. Cardia bifida, defective heart development and abnormal neural crest migration in embryos lacking hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Cardiovascular Research* 60:569-579.

CLOSTER A. M., VAN AS P., GROENEN M. A. M., VEREIJKEN A. L. J., VAN ARENDONK J. A. M., y BOVENHUIS H. 2009. Genetic and phenotypic relationships between blood gas parameters and ascites-related traits in broilers. *Poultry Science* 88:483-490.

DONG Y., WANG X., ZHU H., TREIBER F. A., SNIEDER H. 2004. Endothelin-1 gene and progression of blood pressure and left ventricular mass: longitudinal findings in youth. *Hypertension* 44(6):884-890. *Abstract*.

DRUYAN S., HADAD Y., y CAHANER A. 2008. Growth rate of ascites-resistant versus ascites-susceptible broilers in commercial and experimental lines. *Poultry Science* 87:904–911.

EWING B., HILLIER L.D., WENDL M., y GREEN P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research* 8:175-185.

GOMEZ A. P., MORENO A., IGLESIAS P., CORAL P., HERNANDEZ A. 2007. Endothelin 1, its Endothelin type A receptor, connective tissue growth factor platelet growth factor and adrenomedullin expression in lungs of pulmonary hypertensive and nonhypertensive chickens. *Poultry Science* 86:909-916.

GÓMEZ R. A. P. 2008. Regulación de la expresión de la endotelina 1 y su receptor ETA y de la sintasa de óxido nítrico en pulmones de pollo de engorde sanos y con hipertensión arterial pulmonar por hipoxia hipobárica. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Doctorado en Ciencias-Salud Animal. Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, D.C.

FARACI M. F. 1986. Circulation during hypoxia in birds. *Comp. Biochem. Physiol.* 85A(4):613:620.

HERNANDEZ V. A. 1987. Hypoxic ascites in broilers: a review of several studies done in Colombia. *Avian diseases* 31:658-661.

HERNÁNDEZ V. A. y USECHE O. J. 1991. Ascitis aviar de origen hipóxico (hipertensión pulmonar): Fisiopatología y normas de manejo. 1° Edición. Empresa Editorial Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

HIBI K., ISHIGAMI T., TAMURA K., MIZUSHIMA S., NYUI N., FUJITA T., OCHIAI H., KOSUGE M., WATANABE Y., YOSHII Y., KIHARA M., KIMURA K., ISSHII M. y UMEMURA S. 1998. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension* (32):521-526-

HU C-J., WANG Y-L., CHODOSH L. A., KEITH B., y SIMON M. C. 2003. Differential Roles of Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and HIF-2  $\alpha$  in Hypoxic Gene Regulation. *Molecular and Cellular Biology*, 23(24):9361–9374.

HUANG Y., HICKEY R. P., YEH J. L., LIU D., DADAK A., YOUNG L. H., JOHNSON R. S. y GIORDANO J. F. 2004. Cardiac myocytes-specific HIF-1 $\alpha$  deletion alters vascularization, energy availability, calcium flux, and contractility in the normoxic heart. *The FASEB journal* (4):1510-1531.

HYNDMAN M.; PARSONS H.; VERMA S.; BRIDGE J.; EDWORTHY S.; JONES C.; LONN E.; CHARBONNEAU F.; ANDERSON T. 2002. The T-786 mutation in endothelial nitric oxide synthase is associated with hypertension. *Hypertension* 39:919-922.

INIESTA R., GUINO E., MORENO V. 2005. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gac Sanit* 19(4):333-41.

JEMAA R., BEN A. S., KALLEL A., FEKI M., ELASMI M., TAIEB H. S. SANHAJI H., OMAR S., KAABACHI N. 2009. Association of a 27-bp repeat polymorphism in intron 4 of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with hypertension in a tunisian population. *Clinical Biochemistry* 42:852-856.

JARAMILLO P. C., LANAS C., LANAS F., SALAZAR L. A. 2010. Polymorphisms of the NOS3 gene in Southern Chilean subjects with coronary artery disease and control. *Clinica Chimica Acta* 411:258-262.

JIN J. J., NAKURA J., YAMAMOTO M., TABARA Y., YAMAMOTO Y., IGASE M., KOHARA K., MIK T. 2003. Association of endothelin-1 gene variant with hypertension. *Hypertension* 41(1) Abstract.

KAKINUMA Y., MIYAUCHI T., YUKI K., MURAKOSHI N., GOTO K., YAMAGUCHI I. 2001. Novel molecular mechanism of increased myocardial endothelin-1 expression in the failing heart involving the transcriptional factor hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  induced for impaired myocardial energy metabolism. *Circulation* 103:2387-2394.

KALUZ S., KALUZOVÁ M., y STANBRIDGE. 2008. Regulation of gene expression by hipoxia: integration of the HIF-transduced hypoxic signal at the hypoxia-responsive element. *Clin Chim Acta*. Septiembre; 395(1-2):6-13.

LEVIN E. R. 1995. Endothelins. *The New England Journal of Medicine* 333:356–363.

LI Z., LAI Z., YA K., FANG D., WING H. Y., LEI Y., MING Z. Q. 2008. Correlation between the expression of divalent metal transporter 1 and the content of hypoxia-inducible factor-1 in hypoxic HepG2 cells. *J. Cell. Mol. Med.* 12(2):569-579.

MATTICK J. S. 2010. Los intrones. Investigación y Ciencia. Tema 59. 1er trimestre 2010:13-19.

MAZURE N. M., BRAHIMI-HORN M. C., BERTA M. A., BENIZRI E., BILTON R. L., DAYAN F., GINOUVÉS A., BERRA E., POUYSSÉGUR J. 2004. HIF-1: master and commander of hypoxic world a pharmacological approach to its regulation by siRNAs. *Biochemical Pharmacology* 68:971-980.

MEJÍA G. 1982. Influencia del frío en la ascitis de origen hipóxico en los pollos de engorde. Trabajo de Grado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Bogotá D.C.

MIYAMOTO Y., SAITO Y., YOSHIMURA M., SHIMASAKI Y., NAKAYAMA M., KAMITANI S., HARADA M., ISHIKAWA M., KUWAHARA K. *et al.* 1998. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated essential hypertension. *Hypertension* 32:3-8.

MODESTI A. P., VANNI S., MORABITO M., MODESTI A., MARCHETTA M., GAMBERI T., SOFI F., SAVIA G., MANCIA G., GENSINI G. F., PARATI G. 2006. Role of endothelin-1 in exposure to high altitude: acute mountain sickness and endotelina-1 (ACME-1) study. *Circulation* 114:1410-1416.

MORENO DE SANDINO M., HERNANDEZ V. A. 1985. Variación cardiopulmonar y en valores de hemoglobina y hematocrito durante la hipoxia en pollos comerciales y criollos. *Revista Facultad Medicina Veterinaria y de Zootecnia* 38(1):11-20

MORENO DE SANDINO M., HERNANDEZ A. 2003. Nitric oxide synthase expression in the endothelium of pulmonary arterioles in normal and pulmonary hypertension chicken subjected to chronic hypobaric hypoxia. *Avian Diseases* 47(4):1291-1297.

MORENO DE SANDINO M. 2004. Posible papel del óxido nítrico (ON) en el síndrome de hipertensión pulmonar hipóxica aviar. Tesis doctoral en Ciencias-Salud Animal. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de Ciencias para la Salud Animal, Bogotá D.C.

OLKOWSKI A. A. 2007. Pathophysiology of heart failure in broilers chickens: structural, biochemical, and molecular characteristics. *Poultry Science* 86:999-1005.

PAGANI F. y BARALLE F. E. 2004. Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers. *Nature Reviews* 5:389-396.

PAN J. Q., LI J. C., SUN W. D. and WANG X. L. 2005. Effects of early feed restriction and cold temperature on lipid peroxidation, pulmonary vascular remodeling and ascites morbidity in broilers under normal and cold temperatures. *British Poultry Science* 46:374-381.



PADKEL A., VAN ARENDONK J. A. M., VEREIJKEN A. L. J., y BOVENHUIS H. 2005. Genetic parameters of ascites-related traits in broilers: effect of cold and normal temperature conditions. *British Poultry Science* 46(1):335-42.

RABIE T. 2004. Pulmonary hypertension syndrome in chicken: peaking under QTL peaks. *Doctoral thesis. Wageningen University, The Netherlands*. 168 p.

SCHEELE C. W., VAN DER KLIS J. D., KWAKERNAAK C., DEKKER R. A. VAN MIDDELKOOP J. H., BUYES J., y DECUYPERE. 2005. Ascites and venous carbon dioxide tensions in juvenile chicken of highly selected genotypes and native strains. *World' Poultry Science Journal*; Marzo, 61:113-129.

SCHEFFIELD V. C., BECK J. S., KWITEK A. E., SANDSTROM D. W., y STONE E. M. 1993. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 16:325-332.

SEARLES C. D. 2006. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. *Am. J. Physiol. Cell Physiol* 291:C803-C816.

SEMENZA L. G. 2004. O<sub>2</sub>-regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory by HIF-1. *J. Appl Physiol* 96:1173-1177.

SEVILLA S. D. 2007. Metodología de los estudios de asociación genética. *Insuficiencia Cardíaca* 2(3):111-114.

SHOHET R. V., y GARCIA J. A. 2007. Keeping the engine primed: HIF factors as key regulators of cardiac metabolism and angiogenesis during ischemia. *J Mol Med* 85:1309–1315.

SMITH T. G., ROBBINS P. A., y RATCLIFFE P. J. 2008. The human side of hypoxia-inducible factor. *Britis Journal of Haematology* 141: 325-334.

STROKA D. M., BURKHARDT T., DESBAILLETS I., WENGER R. H., NEIL D. A. H., BAUER C., GASSMANN M., y CANDINAS D. 2001. HIF-1 is expressed in

normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *The FASEB Journal* (15):2245-2453.

TAN X., HU S-H., WANG X-L. 2007. Possible role of nitric oxide in the pathogenesis of pulmonary hypertension in broilers: a synopsis. *Avian Pathology*; Agosto, 36(4):261-267.

TAYLOR G. R. 1997. Laboratory methods for the detection of mutations and polymorphisms in AND. CRC Press. New York, 317 pg.

WANG X. L., y WANG J. 2000. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. *Molecular Genetics and Metabolism* 70:241-251.

WANG J., WANG X., XIANG R. y SUN W. 2002. Effect of L-NAME on pulmonary arterial pressure, plasma nitric oxide and pulmonary hypertension syndrome morbidity in broilers. *British Poultry Science* 43:615-620.

WANG G-S. y COOPER T. A. 2007. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nature Reviews* 8:749-761.

WYSZYNSKI D. F. 1998. La epidemiología genética: disciplina científica en expansión. *Pan Am J Public Heal* 3(1):26-34.

ZHANG M. X., SHEN Y. H., WANG J., COSELLI J., y WANG X. L. 2005. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by small RNA. *Proc natl Acad Sci USA* 102:16967-16972.

## 4. Conclusiones y recomendaciones

### 4.1 Conclusiones

El mapa de ligamiento genético ilustró el orden de los genes y los microsatélites sobre el GGA2q: *NOS3-ET1-MCW0245-MCW0314-ADL0164-MCW0282*, además de la distancia relativa entre ellos con lod > 3 y frecuencia de recombinación menor a 0.5 con la excepción del marcador MCW0282. La estimación de ligamiento genético entre los loci *ET1* y *NOS3* establece por primera vez la ubicación cromosómica del gen *NOS3*. Y aunque el análisis de asociación en este trabajo no asocia los polimorfismo hallados en el gen *ET-1* con el síndrome, la importancia del hallazgo recae sobre la posibilidad de nuevas evaluaciones que relacionen el gen con el SHP y la posible utilización del mapa para establecer la ubicación en una región cromosómica de haplotipos con efectos sobre la susceptibilidad al síndrome de hipertensión pulmonar (SHP) en líneas comerciales de pollo de engorde.

La asociación de ligamiento genético entre los 5 loci, implica una reducida frecuencia de recombinación entre ellos durante la meiosis, por lo tanto una mayor probabilidad de segregación del haplotipo, útil para emprender programas de selección asistida por marcadores, con el cual será posible reconocer los alelos de susceptibilidad y seleccionar los de resistencia.

La identificación de tres alelos para cada gen candidato, induce a pensar en la posibilidad de SNPs asociados con la susceptibilidad del pollo de engorde a

desarrollar hipertensión pulmonar en condiciones de hipoxia. Aunque no se debe dejar de lado que la enfermedad es poligénica como en los humanos, así que estos alelos como otras variaciones genéticas estarían ejerciendo un papel importante en la susceptibilidad al síndrome.

El SHP en esta investigación está asociado a las mutaciones encontradas en secuencias reguladoras de la transcripción en los intrones de los genes *NOS3* y *HIF1 $\alpha$*  (heterogeneidad de locus), aunque por separado, los cambios hallados (heterogeneidad alélica) aumentarían el riesgo de desarrollar el síndrome en poblaciones susceptibles.

El descubrimiento de las secuencias reguladoras de la transcripción en los intrones de los genes *NOS3* y *HIF1 $\alpha$* , contribuyen con el conocimiento del mecanismo de acción del SHP de origen hipóxico en grandes alturas y a incluir secciones no codificantes del gen en estudios de predisposición genética a enfermedades.

La alta penetrancia de los genotipos 1/2 de los genes *NOS3* y *HIF1 $\alpha$* , sugiere: 1° que las modificaciones implican severamente en el caso del gen *HIF1 $\alpha$* , su acción como modulador de la respuesta al estímulo hipóxico al no ser transcripcionalmente activo por la falta de unión a elementos de respuesta a la hipoxia en genes como *NOS3*, 2° En el caso del gen *NOS3*, caracterizado por su transcripción constitutiva, los cambios sugeridos en el elemento *cis*-regulador, inactivan su *trans*-activación por factores de transcripción inducibles por hipoxia, por lo que su nivel de expresión no aumenta, lo que conduce a una falla en la modulación del tono vascular o disfunción endotelial del sistema cardiopulmonar de los pollos de engorde.

Con respecto a la proporción de animales que sometidos a las mismas condiciones de hipoxia natural no se enfermaron y se definieron como aves control (37%), pero que poseían los alelos de referencia para desarrollar el SHP en grandes alturas, pero que no fueron secuenciados, es probable que estos polimorfismos se encuentren en otras secciones de los fragmentos amplificados, como sucede con los cambios hallados en *ET-1*, que no fueron asociados con SHP, y aunque muestren un patrón de bandas igual al de las aves enfermas (casos) en los genes *NOS3* e *HIF1 $\alpha$* , con la técnica SSCP empleada para la búsqueda de los SNP, solo se puede evidenciar cambios en la conformación de la cadena, pero no definir la naturaleza ni la posición del cambio. Razón por la que se explica como penetrancia incompleta en el caso de las aves que con determinados genotipos no se enfermaron en grandes alturas.

Aunque determinar el patrón de herencia de las enfermedades complejas no es completamente posible, se podría concluir con la información obtenida, que el patrón de herencia de los polimorfismos hallados en esta investigación fue: autosómica codominante con efecto deletéreo, que se caracteriza por una penetrancia mayor en los animales heterocigotos que en los homocigotos, que produce una pérdida del poder de adaptación de los pollos de engorde provocada por los cambios en los niveles de la transcripción de los genes implicados en condiciones de hipoxia natural crónica.

El corte y empalme alternativo que da origen al factor de transcripción HIF1 $\alpha$  están bajo el control de los requerimientos fisiológicos de la célula y de los tejidos en condiciones de hipoxia crónica, pero alteraciones de la secuencia del gen intrínsecas en los elementos *cis* generan cambios de la regulación post-transcripción que impiden que activaciones en *trans* se lleven a cabo, dando origen a la susceptibilidad de desarrollar procesos patológicos como el síndrome de hipertensión pulmonar en los pollos de engorde.

La predisposición al SHP de pollos de engorde tiene un origen genético que involucra polimorfismos hallados en los genes *NOS3* y *HIF-1 $\alpha$* .

## 4.2 Recomendaciones

Con respecto al mapa de ligamiento genético, este debe refinarse, saturando con el mayor número posible de microsatélites para definir los resultados de ligamiento entre los dos loci, con el fin de tener mayor seguridad a la hora de usar la información generada en este estudio en programas de selección asistida por marcadores.

Los alelos hallados son importantes en la etiopatología genética, pero no son suficientes para determinar las características por sí solos, como se puede constatar con la penetrancia de los genotipos; se requiere de la presencia de factores ambientales que predispongan o eviten el desarrollo del SHP, sería de utilidad replicar los estudios en normoxia y en hipoxia, en otras líneas comerciales con el fin de validar la información concebida.

También sería de utilidad realizar estudios de desequilibrio de ligamiento con el ánimo de predecir una mejor segregación de los haplotipos de resistencia y validar los datos obtenidos en este estudio.

Con respecto al análisis de los fragmentos amplificados en cada gen implicado en la susceptibilidad a desarrollar el síndrome, se deberían realizar ensayos de expresión empleando herramientas como microarreglos en los que se pueda definir: 1° que el elemento de respuesta hallado en el gen *eNOS* sea funcional y que los cambios en esta secuencia consenso, provocan cambios en la respuesta

de adaptación a la hipoxia natural crónica, generando hipertensión pulmonar, 2° que identifique que los cambios hallados en la secuencia del intrón 6 del gen *HIF1α*, genera cambios en la señal de corte y empalme alternativo del factor de transcripción y que esta podría ser una causa de las fallas de expresión a nivel pulmonar de pollos de engorde susceptibles a enfermarse en grandes alturas y 3° Incluir dentro de estos estudios al gen *ET-1* por su papel en la fisiopatología de la enfermedad y porque en si el factor HIF1α está disponible en menor concentración en pollos enfermos, los valores aumentados de endotelina-1 posiblemente se deban a un sistema de regulación distinto al de *trans* activación por el factor de transcripción en hipoxia.

Este estudio también podría ser utilizado para seguir avanzando en la etiopatología genética de la hipertensión pulmonar en humanos, atribuido a la similitud en los hallazgos clínicos, localización ortóloga de los genes relacionados y conservación de elementos de regulación *cis* y *trans* activación de la transcripción.





