

# Síndrome de hipertensión pulmonar ¿un origen genético en pollos de engorde? Pulmonary hypertension syndrome ¿does it have a genetic origin in broiler chickens?

Juana Moncaleano-Vega<sup>1\*</sup>, Fernando Ariza<sup>2\*</sup>, Aureliano Hernández<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>MVZ, MSc©, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá

<sup>2</sup> MV, MSc, PhD, Profesor Asociado. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá

<sup>3</sup> MV, MSc, PhD, Profesor Titular. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá

\* Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia

e-mail: jsmoncaleanov@unal.edu.co

*Recibido: Octubre 11 de 2010. Aprobado: Enero 18 de 2011*

## RESUMEN

La identificación de por lo menos el 83 % de polimorfismos de nucleótido simple de tipo no sinónimo en líneas comerciales de alto rendimiento como el pollo para asadero, ponedoras y gallinas de plumaje sedoso, proporcionan información acerca de la tasa de variación en la secuencia de nucleótidos del genoma del pollo, la cual ocurre cada  $5 \times 10^{-3}$  nucleótidos. Es importante encontrar asociaciones entre dichas variantes con características fenotípicas de interés como la susceptibilidad o la resistencia a enfermedades y tal es el caso de la hipertensión arterial pulmonar, síndrome ampliamente reconocido en pollos de engorde, que ocasiona hasta un 30 % de la mortalidad en líneas comerciales de rápido crecimiento. Un paso hacia la identificación de estas asociaciones es el empleo tanto de herramientas moleculares como de modelos estadísticos que permitan obtener en corto tiempo los resultados necesarios para iniciar un plan adecuado de selección y mejoramiento.

El presente documento describe la metodología de secuenciación del genoma del pollo doméstico, el uso de técnicas de identificación de polimorfismos de genes candidatos en pollos comerciales susceptibles al Síndrome de Hipertensión Pulmonar y las implicaciones actuales generadas por la implementación de técnicas de genética molecular en busca de un mayor conocimiento del genoma de las especies domésticas nativas.

**Palabras clave:** marcadores genéticos, SNPs, whole-genome shotgun, Gallus gallus, epidemiología genética, regresión logística.

## ABSTRACT

At least 83 % of non-synonymous polymorphisms which are of the simple nucleotide type have been identified in high performance commercial birds, such as Broiler, Layer and Silkie. This has allowed the collection of information about the variation rate in the nucleotide sequence in the chicken genome. The abovementioned

variation occurs at  $5 \times 10^{-3}$  intervals in the nucleotide chain. It is important to look for associations among those variations, related to key phenotype characters, such as disease resistance or susceptibility. An example is the pulmonary arterial hypertension in meat-type broilers, a syndrome which accounts for nearly 30 % of mortality.

A step toward the identification of these associations has been implemented by using both molecular technologies and statistical models that allow the generation of quick results useful in the implementation of breeding and selection programs.

The present document describes both, the methodology for sequencing the domestic chicken genome and the polymorphism identification within candidate genes of susceptible broiler chickens prone to develop hypoxic pulmonary hypertension. Current implications to increase the knowledge about native species genome related to the use of molecular genetics are also discussed.

**Key Words:** genetic markers, SNPs, whole-genome shotgun, *Gallus gallus*, genetic epidemiology, logistic regression.

## 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 en 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) y expresión del RNA mensajero de los genes endotelina uno (ET1), adrenomedulina (Gómez *et al.*, 2007), síntesis de óxido nítrico sintasa tres (NOS3) (Moreno de Sandino, 2004; Gómez, 2008), sugieren que existe un factor genético relacionado con la susceptibilidad a desarrollar SHP en pollos de engorde sometidos a 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 y NOS3 y probablemente a un grupo adicional de ellos, podrían ser responsables de la presentación del síndrome (Rabie, 2005; Gómez *et al.*, 2007; Druyan *et al.*, 2007). Para Range *et al.* (2002) y Druyan *et al.* (2007), la alta morbilidad y el aumento en la mortalidad en la producción avícola se atribuyen 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 SHP de origen hipóxico en una estirpe moderna de pollos de engorde (Vásquez, 2010). Un hecho importante en la identificación de un posible origen genético de la enfermedad, es la realización de estudios de asociación genética, donde se busque establecer una relación estadística entre las variaciones de genes candidatos y los valores fenotípicos generados por el SHP. Así, es posible la selección de individuos con alelos de susceptibilidad o resistencia. El objetivo de la presente revisión es describir los métodos empleados actualmente en la secuenciación del genoma del pollo e ilustrar algunas técnicas de detección de la variación de las secuencias de nucleótidos dentro de genes nominados como candidatos, responsables de la susceptibilidad o resistencia al SHP. Igualmente se discutirá la importancia de la aplicación de técnicas de genética molecular en el estudio de los genomas de especies domésticas nativas.

### 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, en parte debida al tamaño del genoma de  $1.2 \times 10^9$  pb (Schmid *et al.*, 2000; Groenen *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2003; Emara y Kim, 2003). Aunque el factor

clave fue el bajo contenido de DNA repetitivo, que es de solo 11 %, comparado con lo encontrado en el genoma de los mamíferos (~50 %) (Dequéant y Pourquié, 2005; Burt, 2005; Burt *et al.*, 2007).

El ensamblaje del genoma fue el resultado del alineamiento de secuencias contiguas de una genoteca BAC (Bacterial Artificial Chromosome), generada 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 ensamblaje final debido al contenido de material altamente repetitivo; mientras que los cromosomas autosomales han mostrado una cobertura del 98 %,

basada en el amalgamamiento de secuencias de clones BAC de alta calidad. Esta sobreposición de los clones de cDNA sugiere que entre un 5 % y un 10 % de los genes no se encuentran en el ensamblaje final debido a la presencia de genes duplicados y regiones ricas en GC, convirtiéndose este factor en una gran limitante para el sistema de ensamblaje (Burt, 2005). Un ejemplo es la región del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) sobre el cromosoma 16 y el cromosoma W (Carre *et al.*, 2006). Aunque la distribución de las secuencias sobre los cromosomas demuestra que el %GC, concentración de islas CpG y densidad de genes es 1,6 veces superior en los microcromosomas que en los macrocromosomas (Shmid *et al.*, 2000; Carre *et al.*, 2006), con una mayor tasa de recombinación en los microcromosomas (Burt, 2005) Tabla 1.

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

| Rango                          | Macrocromosoma | Microcromosoma |
|--------------------------------|----------------|----------------|
| Densidad genética (por Mb)     | 110 a 154      | 133 a 412      |
| Longitud de intrones (pb)      | 486 a 5742     | 1867 a 4128    |
| Longitud de exones (pb)        | 164 a 171      | 157 a 172      |
| Longitud intergénica (kb)      | 18 a 21        | 8 a 24         |
| Contenido de GC (%)            | 38.4 a 40.1    | 40.9 a 50.1    |
| Densidad de islas CpG (por Mb) | 29 a 49        | 73 a 266       |
| LINs (%)                       | 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 secuencias ortólogas a intervalos de 1.8 Mb a partir del cromosoma humano 7q31, alineándolo 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 del humano se alinean con las del pollo, pero solo 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; Emara y Kim, 2003), pero con la falta de elementos SINEs (secuencias repetidas dispersas en el genoma de función desconocida) (Burton, 2005).

La página web Ensembl contiene el primer resultado de predicción de genes y proteínas basado en el alineamiento de etiquetas de secuencias expresadas

(EST: expressed sequence tag) de las proteínas de pollo y mamíferos empleando para esto los programas GeneScan, ab initio, TWINSKAN, y SPG-2 ([http://www.ensembl.org/Gallus\\_gallus/](http://www.ensembl.org/Gallus_gallus/)): 17,707 genes con 28,491 transcritos, de los cuales el 30 % se deben a cortes y empalmes alternativos y 11,030 genes ortólogos con genes humanos (Dequéant y Pourquié, 2005; Burt, 2005;). Tabla 2. Otras bases de datos que contiene información sobre 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, esto indica que los microcromosomas tienen una alta tasa de recombinación: 6.4 cM/Mb comparados con 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).

### Variaciones genéticas

En paralelo con el proyecto de secuenciación del genoma, se construyó un mapa de variaciones genéticas que contiene 2.833.578 de polimorfismos de nucleótido simple (SNP) identificados en tres líneas comerciales de pollos domésticos (pollo para asadero, gallina ponedora y gallinas 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 razas. Una segunda oportunidad de secuenciación confirmó el 94 % de los SNPs, de los cuales el 83 % son SNPs 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 instancia. 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 3). 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 ha aumentado el número de estos polimorfismos conocidos dentro de los genomas de las 3 líneas comerciales 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) 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 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, la cual 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). Hoy, las bases de datos poseen un inventario de 2.970.811 SNPs. La segregación común de SNPs entre líneas provee información sobre un gran número de genes candidatos en un loci de características cuantitativas (QTL), los cuales controlan rasgos económicos en los pollos de engorde que estarían disponibles para mejorar la eficiencia y reducir los costos de la industria avícola. Los mapas de QTL para líneas comerciales de pollo de engorde incluyen 1200 loci, con ~200 características de importancia económica como crecimiento, tamaño de la canal, peso corporal, conversión de alimento, deposición de grasa y ~400 genes, entre ellos genes de susceptibilidad a la enfermedad de Marek (Lipkin *et al.*, 2002; Burt *et al.*, 2007), salmonella y coccidiosis (Emara y Kim, 2003).

**Tabla 2.** Frecuencia de clase de genes y predicción de proteínas (Ensembl, junio 2004)

| Familia génica         | Número                                | Función  |
|------------------------|---------------------------------------|--|
| tRNA                   | 280                                   | RNA de transferencia, adaptador en la traducción.  |
| 5S rRNA                | 12                                    | RNA ribosómico, componente del ribosoma.   |
| 5.8S rRNA <sub>a</sub> | ~145                                  | RNA ribosómico, componente del ribosoma.   |
| 18S rRNA <sub>a</sub>  | ~148                                  | RNA ribosómico, componente del ribosoma.   |
| 28S rRNA <sub>a</sub>  | ~148                                  | RNA ribosómico, componente del ribosoma.   |
| mRNP U1                | 18                                    | Corte y empalme mayor.   |
| mRNP U2                | 6                                     | Corte y empalme mayor.   |
| mRNP U4                | 4                                     | Corte y empalme mayor.   |
| mRNP U5                | 9                                     | Corte y empalme mayor y menor.   |
| mRNP U6                | 15                                    | Corte y empalme mayor.   |
| mRNP U4atac            | 1                                     | Corte y empalme intermedio.  |
| mRNP U5atac            | 4                                     | Corte y empalme menor.   |
| mRNP U11               | 1                                     | Corte y empalme menor.   |
| mRNP U12               | 1                                     | Corte y empalme menor.   |
| mRNA                   | 131                                   | Repetición de la traducción.   |
| mRNA                   | 83                                    | RNA nuclear pequeño, desempeña un papel en el procesamiento de rRNA.   |
| RNaseP                 | 1                                     | Ribosoma, procesa tRNA.  |
| mRNP U7                | 1                                     | Procesa el pre-miRNA de las hebras a partir de la replicación del extremo 3'.  |
| SRP                    | 3                                     | RNA compone parte de las señales de reconocimiento de partículas.  |
| TSK                    | 4                                     | Unión de P <sup>0</sup> -TEFb, el cual activa la transcripción y la fosforilación del dominio C-terminal de la RNA pol II. Este proceso es regulado negativamente por TSK RNP. |
| Y RNA                  | 1                                     | Componente del Ro RNP asociado con Ro90 y La. Función no conocida.   |
| Telomerasa RNA         | 1                                     | Provee el molde para la síntesis telomérica de ADN.  |
| IBC                    | 1                                     | Coopera con e-myc en la diferenciación de B y mitocriocitogénesis.   |
| Total de genes RNA     | 571 (1441 incluidos<br>1m Genes rRNA) |  |

a Repeticiones de 40-kb de DNA ribosómico. Tomado de Burt, 2005

**Tabla 3.** Frecuencia de SNPs en Red Jungle Fowl comparada con tres líneas de pollos domésticos

| Comparación                        | Número de SNPs | I. (efectividad) | SNPs kb-1 |
|------------------------------------|----------------|------------------|-----------|
| <b>América vs domésticos</b>       |                |                  |           |
| RJP-doméstico                      | 1,741,548      | 197,431,317      | 5.28      |
| RJP-lajay                          | 899,377        | 179,388,544      | 5.21      |
| RJP-estilo                         | 1,217,817      | 217,841,171      | 5.59      |
| <b>Entre líneas domésticas</b>     |                |                  |           |
| Brazil-lajay                       | 194,663        | 37,566,860       | 5.16      |
| Brazil-estilo                      | 257,848        | 47,334,311       | 5.42      |
| Lajay-estilo                       | 246,914        | 42,682,908       | 5.79      |
| <b>Dentro de líneas domésticas</b> |                |                  |           |
| Brazil-lajay                       | 69,321         | 13,815,075       | 4.29      |
| Lajay-lajay                        | 40,412         | 10,883,395       | 3.72      |
| Estilo-estilo                      | 83,636         | 15,217,383       | 5.88      |

Adaptado de International Chicken Polymorphism Map Consortium, 2004

Entre otras tecnologías disponibles para la búsqueda y la identificación de variaciones tipo SNP, término que también incluye delecciones 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)).

### Síndrome de hipertensión pulmonar, ¿un origen genético en pollos 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 hipertensión arterial pulmonar (HAP). Investigaciones realizadas en pollos comerciales vs pollos criollos, en las 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 hemoglobina-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 de HAP 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 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 (Engelhard *et al.*, 2005). Estos recolectan información sensorial sobre cambios en la concentración de oxígeno arterial, CO<sub>2</sub> y pH, que es llevada al tallo neuronal cerebral que regula la respiración (Semenza, 2004). En condiciones de normoxia e hipoxia, la expresión de los quimiorreceptores está regulada por el factor inducido por hipoxia 1 (HIF-1), un factor de transcripción, que desde 1992 fue reconocido como regulador homeostático de oxígeno a nivel celular. Bajo condiciones de hipoxia, el HIF-1 subunidad alfa (HIF-1 $\alpha$ ), se acumula en el núcleo de las células endoteliales de vasos pulmonares, hematopoyéticas y enterocitos, donde se produce la formación de heterodímeros que se unen a secuencias consenso de elementos de respuesta a la hipoxia (HRE: hypoxic response elements), quienes están constituidos por los promotores de genes blanco como: ET-1, EPO (eritropoyetina) y DMT1 (transportador de metales bivalentes-1), incrementando así 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 dentro del enterocito (Li *et al.*, 2008).

Para probar la función del factor de transcripción, se utilizaron ratones con el gen HIF-1 $\alpha$  mutado (HIF-1 $\alpha^{+/}$ ) y silvestre, y se expusieron a hipoxia crónica (10 %) de 1 a 6 semanas. Los ratones HIF-1 $\alpha^{+/}$  desarrollaron policitemia significativa, comparados con el tipo silvestre. El efecto es consistente con la identificación inicial de HIF-1 $\alpha$  como activador del gen EPO que codifica para la elaboración de la eritropoyetina. El desarrollo de HAP debida a la hipoxia, se manifestó por presencia de hipertrofia ventricular derecha y un incremento de la presión ventricular en ratones HIF-1 $\alpha^{+/}$ . A las 3 semanas de exposición a la hipoxia crónica los ratones HIF-1 $\alpha^{+/}$ , también presentaron arteriolas pulmonares pequeñas, como consecuencia de la remodelación inducida por

la hipoxia, con un aumento en el número de vasos completamente muscularizados con 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. Igualmente se encontró que la despolarización de las células musculares lisas de arteriolas pulmonares en los ratones HIF-1 $\alpha^{+/}$ , no fue debida a la actividad de los canales de K<sup>+</sup>. Los cuerpos carotídeos aislados de los ratones HIF-1 $\alpha^{+/}$ , 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 HIF-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha^{+/}$ ), resulta en la pérdida dramática y específica de la sensibilidad al oxígeno por los cuerpos carotídeos (Semenza, 2004).

El aumento en la expresión de ET-1 en el endotelio vascular, causado por la unión en trans del HIF-1 $\alpha$ , 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<sup>A</sup> (receptor A de Endotelina) y ET<sup>B</sup> (receptor B de Endotelina). Los receptores ET<sup>A</sup> 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<sup>B</sup> 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, por la activación de la difusión del 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 del genotipo a hipertensión pulmonar en humanos, sugieren que el polimorfismo G/T (cambio de Guanina a Timina) en el codón 198 del exón 5 en el gen ET-1, sustituye el aminoácido

Lisina (Lys) por Asparagina (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). Los resultados del trabajo de investigación de Gómez (2008) sugiere que los genes ET-1, ET<sup>A</sup>, eNOS (óxido nítrico sintasa endotelial), CTGF (factor de crecimiento de tejido conectivo) y AM (adrenomedulina), posiblemente desempeñan un papel importante en la fisiopatología de la hipertensión pulmonar; demostrando por primera vez que la expresión del ARNm de los genes ET<sup>A</sup>, CTGF y AM, se incrementan significativamente ( $p < 0.001$ ) en los pulmones de pollos de engorde con hipertensión pulmonar (Gómez *et al.*, 2007).

El aumento en la expresión de ET-1, excluye la expresión del gen para la enzima NOS3 o eNOS (Groenendijk *et al.*, 2005) que produce ON (óxido nítrico) a partir de L-arginina (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 se comporta como un factor antiproliferativo en la diferenciación de tejidos y desarrollo de órganos (Hemish *et al.*, 2003). En recientes investigaciones se demostró que las alteraciones de este gen en los humanos, afectan el metabolismo de 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 ella se asocia con infarto del miocardio. Además sugiriendo un factor genético de susceptibilidad al examinar el número variable de repeticiones en grupo (VNTRs: variable number of tandem repeats) en el intron 4 (NOS3 4b/4a), junto a dos polimorfismos más identificados en los intrones 18 y 23.

Para el 2002, Hyndman *et al.* encontraron otro punto de mutación en el extremo 5' del gen en 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 mayoría de la población hipertensa (106/705) contribuye a incrementar el riesgo de sufrir hipertensión. En el pollo de engorde, Moreno de Sandino en el año 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 2008, reporta que la expresión de los genes eNOS y ET<sup>A</sup> está aumentada en los pulmones de pollos sin hipertensión pulmonar.

### Perspectivas

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 (Wyszynki, 1998; Sevilla, 2007) además de evaluar las interacciones entre los polimorfismos y otros factores de riesgo (Wyszynki, 1998; Iñiesta *et al.*, 2005) Basados en la revisión, las investigaciones realizadas en humanos (Miyamoto *et al.*, 1998; Hyndman *et al.*, 2002; Jin *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2004), en ratones (Semenza, 2004) y en pollos (Moreno de Sandino, 2004; Gómez *et al.* 2007; Groenendijk *et al.*, 2008), prueban el papel de los genes ET-1, NOS3 y HIF1 $\infty$  en la susceptibilidad genética para desarrollar hipertensión pulmonar. 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 existencia de diferentes



alelos en cada uno de estos genes originaría variación genotípica en la población de estudio y esta a su vez podría conducir a la variación fenotípica de susceptibilidad al SHP.

Por otra parte, sería importante incluir dentro de estas investigaciones las especies consideradas dentro de

## REFERENCIAS

Baltazares LM, Rodriguez CJ, Ortega MJ, Sotres VA, Baltazares LME. Sistema endotelina. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 2005; 18(4):308-320.

Brown RA, Hubbard SJ, Ticle C, Wilson SA. The chicken as a model for large-scale analysis of vertebrate gene function. *Nature* 2003; 4:87-98.

Burt DW. Chicken genome: current status and future opportunities. *Genome research* 2005; 15:1692-1698.

Burt DW, White SJ. Emergence of the chicken as a model organism: implications for agriculture and biology. *Poultry science* 2007; 86:1460-1471.

Burton RR, Smith AH. The effect of polycythemia and chronic hypoxia on heart mass in the chicken. *Journal of applied Physiology* 1967; 22(15):782-785.

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

Carre W, Wang X, Poter TE, NYS Y, Tang J, Bernberg E, Morgan R, Burnside J, Aggrey SE, Simon J, Cogburn LA. 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* 2006; 25:514-524.

Cueva S, Sillau H, Valenzuela A, Ploog H. High altitude induced pulmonary hypertension and right heart failure in broilers chicken. *Research in Veterinary Science* 1974; 16(6):370-374.

Dequéant ML, Pourquié O. Chicken genome: new tools and concepts. *Developmental dynamics* 2005; 232:883-886.

Dong Y, Wang X, Zhu H, Treiber FA, Snieder H. Endothelin-1 gene and progression of blood pressure

los recursos zoogenéticos autóctonos, ya que se podrían generar líneas nativas comerciales de rápido crecimiento, con buenos índices de conversión y calidad definida del producto, sin una susceptibilidad a las condiciones del medio ambiente, incluidas la hipoxia ambiental y la temperatura.

and left ventricular mass: longitudinal findings in youth. *Hypertension* 2004; 44(6):884-890. Abstract.

Druyan S, Shlosberg A, Cahaner A. 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* 2007; 86:621-629.

Emara MG, Kim H. Genetic markers their application in poultry breeding. *Poultry Science* 2003; 82:952-957.

Engelhardt VW, Breves G. 2005. Fisiología veterinaria, capítulo 11. Editorial ACRIBIA, S.A. Zargosa, España.

Förstermann U, Boissel JP, Kleinert H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *The FASEB Journal* 1998;12:773-790.

Gómez RAP. 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 AP, Moreno A, Iglesias P, Coral P, Hernandez A. 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* 2007;86:909-916.

Groenen MAM, Cheng HH, Bumstead N, Benkel BF, Elwood Briles W, Burke T, Burt DW, Crittenden LB, Dodgson J, Hillel J, Lamont S, Ponce de Leon A, Soller M, Takahoshi H, Vignal A. A consensus linkage map of the chicken genome. *Genome Research* 2000;10:137-147.

- Groenendijk BCW, Hierck PB, Vrolijk J, Baiker M, Pourquie MBJM. Changes in shear stress-related gene expression after experimentally altered venous return in the chicken embryo. *Circ Res.* 2005; 96:1291-1298.
- Groenendijk BCW, Stekelenburg-de Vos S, Vennemann P, Wladimiroff JW, Nieuwstadt FTM, Lindken R, Westerweel J, Hierck B, Ursem NTC, Poelmann RE. The endothelin-1 pathway and the development of cardiovascular defects in the haemodynamically challenged chicken embryo. *Journal of Vascular Research* 2008; 45: 54-68.
- Hemish J, Nakaya N, Mittal V, Enikolopov G. Nitric oxide activates diverse signaling pathways to regulate gene expression. *Journal of biological chemistry* 2003; 278(43):42321-42329.
- Hernández A. 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* 1982; 35:1.
- Hernández A. 1984. Disminución de la incidencia de la ascitis aviar de origen hipóxico en el incremento de la temperatura en los galpones. XIV Congreso Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Cartagena. Memorias, pag. 6.
- Hyndman M, Parsons H, Verma S, Bridge J, Edworthy S, Jones C, Lonn E, Charbonneau F, Anderson T. The T-786 mutation in endothelial nitric oxide synthase is associated with hypertension. *Hypertension* 2002;39:919-922.
- Inesta R, Guino E, Moreno V. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gac Sanit.* 2005;19(4):333-41.
- International Chicken Polymorphism Map Consortium. A genetic variation map for chicken with 2.8 million single-nucleotide polymorphisms. *Nature* 2004; 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 JJ, Nakura J, Yamamoto M, Tabara Y, Yamamoto Y, Igase M, Kohara K, Mik T. Association of endothelin-1 gene variant with hypertension. *Hypertension* 2003; 41(1):163-167. Abstract.
- Jurinke C, Denissenko MF, Oeth P, Ehrich M, Van Den Boom D, Cantor CR. A single nucleotide polymorphism based approach for the identification and characterization of gene expression modulation using MassARRAY. *Mutation Research* 2005; 573:83-95.
- Li Z, Lai Z, Ya K, Fang D, Wing HY, Lei Y, Ming ZQ. 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.* 2008; 12(2):569-579.
- Lipkin E, Fulton J, Cheng H, Yonash N, Soller M. 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* 2002;81:283-292.
- 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.* Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated essential hypertension. *Hypertension* 1998; 32:3-8.
- Modesti AP, Vanni S, Morabito M, Modesti A, Marchetta M, Gamberi T, Sofi F, Savia G, Mancia G, Gensini GF, Parati G. Role of endothelin-1 in exposure to high altitude: acute mountain sickness and endothelin-1(ACME-1) study. *Circulation* 2006;114:1410-1416.
- Moreno de Sandino M, Hernandez VA. Variación cardiopulmonar y en valores de hemoglobina y hematocrito durante la hipoxia en pollos comerciales y criollos. *Revista Facultad Medicina Veterinaria y de Zootecnia* 1985; 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 AA. Pathophysiology of heart failure in broilers chickens: structural, biochemical, and molecular characteristics. *Poultry Science* 2007;86:999-1005.
- Padkel A, VanArendonk JAM, Vereijken ALJ, Bovenhuis H. Genetic parameters of ascites-related traits in broilers: effect of cold and normal temperature conditions. *British Poultry Science* 2005; 46(1):335-42.
- Pan JQ, Li JC, Sun WD, Wang XL. 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* 2005;46:374-381.
- Pulido LM. 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 optar al título de Magister en Ciencias de Salud Animal. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Departamento de Ciencias para la Salud Animal, Bogotá D.C.
- Rabie TS, Crooijmans RP, Bovenhuis H, Vereijken AL, Veenendaal T, Van Der Poel JJ, Van Arendonk JA, Pakdel A, Groenen MA. Genetic mapping of quantitative trait loci affecting susceptibility in chicken to develop pulmonary hypertension syndrome. *Animal Genetic*. 2005;36:468-476.
- Range AK, McEntee MG, McDevitt MR. Genetic and phenotypic relationships between and within support and demand tissues in a single line of broiler chicken. *British Poultry Science* 2002; 43: 518-527.
- Sauer S, Gut IG. Genotyping single-nucleotide polymorphisms by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2002;782:73-87.
- Sauer S. Typing of nucleotide polymorphisms by MALDI mass spectrometry: principles and diagnostic applications. *Clin Chim Acta*. 2006; 363:95-105.
- Semenza LG. O<sub>2</sub>-regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory by HIF-1. *J. Appl Physiol*. 2004, 96:1173-1177.
- Sevilla SD. Metodología de los estudios de asociación genética. *Insuficiencia Cardíaca* 2007; 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 DW, Smith J, A'Hara S, Law A, Griffin DK, *et al*. First report on chicken genes and chromosomes 2000. *Cytogenet Cell Genet*. 2000; 90:169-218.
- Sierra VM, Guzmán GA, Olivares CI, Torres RY, Hicks J. Participación de las especies reactivas del oxígeno en las enfermedades pulmonares. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*. 2004; 17(21) Abstract.
- Vásquez VIC. 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 para optar al título de Magister en Ciencias de Salud Animal. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Departamento de Ciencias para la Salud Animal, Bogotá D.C.
- Wang J, Wang X, Xiang R, Sun W. Effect of L-NAME on pulmonary arterial pressure, plasma nitric oxide and pulmonary hypertension syndrome morbidity in broilers. *British Poultry Science* 2002;43:615-620.
- Wyszynski dF. La epidemiología genética: disciplina científica en expansión. *Pan Am J Public Heal* 1998; 3(1):26-34.
- Ye X, McLeod S, Elfick D, Dekkers JCM, Lamont SJ. Rapid identification of single nucleotide polymorphisms and estimation of allele frequencies using sequence traces from DNA pools. *Poultry science* 2006;85:1165-1168.
- Zhang H, Wu CX, Chamba Y, Ling Y. Blood characteristics for high altitude adaptation in Tibetan chicken. *Poultry Science* 2007; 86:1384-1389.