

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E. A. P. DE MEDICINA VETERINARIA

**El Nitrito como posible donador de óxido nítrico para
prevenir la presentación de casos de ascitis en pollos
Broiler en altura**

TESIS

para optar el título profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Dante Ricardo Vidalón Romo

Lima-Perú

2007

Dedico el presente trabajo a mi mamá Mary, mi papá Arístides, mis hermanos Gino, José, Dany y Marisela, quienes son la base fundamental de mi vida, mi eterno agradecimiento por su amor e incondicional apoyo que me permitió cumplir una etapa importante de mi vida.

Mi eterna gratitud al Dr. Juan Espinoza Blanco, quien gentilmente supo encaminarme. Gracias por el constante apoyo, paciencia cariño y confianza depositada en mi persona.

Gracias a la facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Decana de América, en la cual me forme y cumplí con la meta de ser un buen profesional.

Un agradecimiento especial al Dr. Pedro Angulo, gran amigo y excelente profesional, por la orientación y apoyo brindado durante toda la realización de la presente tesis.

Gracias al IVITA del Mantaro por facilitarme sus instalaciones para la realización de la tesis, de igual forma agradezco al Dr. Ronald y la Dra. Amparo por su valiosa colaboración en el transcurso de la misma.

Al Dr. Ernesto Falcón, la Dra. Maria Vásquez y al Dr. César Lázaro, asesores del presente trabajo de investigación, gracias por su orientación y asesoramiento en la realización de la misma.

A Norma Tello, una persona muy especial en mi vida, gracias por tu amor, paciencia, apoyo y comprensión en los momentos más importantes de mi vida.

A mis amigos de siempre: Magali, Ritza, Oliver, Rodrigo, Marco y Pepe, gracias por su sincera amistad, apoyo, cariño, confianza y ánimos que siempre me brindan desde que los conocí.

TABLA DE CONTENIDOS

INDICE	i
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE CUADROS Y GRÁFICOS	v
I INTRODUCCIÓN	1
II REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. SINDROME ASCÍTICO	4
2.2. CUADRO FISIOPATOLÓGICO DEL SINDROME ASCÍTICO	5
2.3. ÓXIDO NÍTRICO (NO)	11
Características físico-químicas del NO	11
Biosíntesis y función del NO	12
2.4. GENERACIÓN DE “NO” POR XANTINO OXIDASA A PARTIR DE NITRITO	14
III METODOLOGÍA DE TRABAJO	17
3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN	17
3.2. NÚMERO DE ANIMALES	17
3.3. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS	17
3.3.1. Materiales de laboratorio	17

3.4. ADMINISTRACIÓN DEL NIT	19
3.5. TOMA DE MUESTRA	20
3.5.1. Procesamiento de la muestra	20
3.5.2. Determinación de casos ascíticos	21
3.6. ANALISIS ESTADÍSTICO	21
IV RESULTADOS	22
V DISCUSIÓN	27
VI CONCLUSIONES	30
VII RECOMENDACIONES	31
VIII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Comparación de valores promedios de nitritos entre grupo control y tratado a nivel del mar y altura	23
Cuadro 2. Comparación de valores promedios de nitritos entre grupo control vs. control y tratado vs. tratado a nivel del mar y altura	23
Cuadro 3. Promedios de pesos semanales en costa	24
Cuadro 4. Promedios de pesos semanales en altura	24
Cuadro 5. Casos ascíticos encontrados durante la crianza	26

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1. Comparación de valores plasmáticos de nitritos de todos los grupos mediante curvas	25
---	----

RESUMEN

En la zonas altas del territorio Peruano, los pollos comerciales de carne presentan dificultades de aclimatación en las condiciones climatológicas de las alturas, en donde existe una menor presión parcial de oxígeno que provoca una menor captación de oxígeno, provocando una serie de procesos fisiopatológicos que conllevan al desarrollo del Síndrome Ascítico (ASC), generando muchas veces la muerte de los pollos. En el presente trabajo se propone una terapia con Nitrito (NIT) que aporta óxido nítrico (NO) al organismo. El NO es un radical libre que participa en diversos procesos fisiológicos y fisiopatológicos, jugando un papel importante como vasodilatador. A nivel pulmonar esta vasodilatación permite que más oxígeno sea captado y pueda distribuirse a los tejidos que lo necesiten, evitando un esfuerzo cardíaco y de manera indirecta la presentación de ASC. Se ha demostrado que la enzima xantina oxidasa (XO) puede producir NO a partir del NIT en condiciones de hipoxia. En la altura, la administración de NIT provocó una presentación de casos de ascitis control/tratado de 2 a 1. En el trabajo se realizó 2 experimentos con pollos de carne de la línea Cobb –Vantress, una crianza a nivel del mar (Lima) y la otra en altura (IVITA-MANTARO), en ambos lugares se dividió en 2 grupos, uno tratado (NIT 0.1% en agua de bebida) y otro control. Los resultados a nivel del mar muestran una elevada concentración de NIT plasmático en el grupo tratado con respecto a su control, además no se encontró ningún caso de ascitis. Los resultados en altura fueron determinantes, ya que el grupo control presentó 48 casos ascíticos de 100 animales, versus 25 casos de 100 encontrados en el grupo tratado, demostrando que el NIT administrado en el agua ejerció un papel preventivo en el desarrollo del ASC, pero al parecer este efecto se consiguió por la depresión en la ganancia de peso que ejerció el NITRITO. Se concluyó que el NIT administrado al 0.1% en el agua de bebida desde el primer día de edad produjo un efecto depresor en la ganancia de peso y ocasionó menor número de pollos con casos de ascitis, observándose una proporción de presentación de casos de ascitis de 2 a 1 en los grupos control versus el grupo tratado respectivamente.

Palabras claves: NIT = Nitrito, NO = Óxido Nítrico, XO = Xantina Oxidasa

ASC = Síndrome Ascítico.

ABSTRACT

In the highlands of Perú, commercial chickens show difficulties in how to acclimatize in the hard conditions of the highlands, where there is low oxygen partial pressure, causing less oxygen capture and developing several physiopathological processes which finish in Ascitic Syndrome in Chicken (ASC) and in the most of the cases with the death of the chickens. In the current project is proposed a therapy with Nitrite (NIT), which gives Nitric Oxide (NO) to the organism. NO is a free radical that participate in different physiological process and physiopathological, playing an important role as a vasodilator. In the lungs this vasodilatation helps in the capture of more oxygen, avoiding a heart effort and indirectly the presentation of ASC. It is demonstrated that the enzyme Xantine Oxidase (XO) can produce NO from Nitrite under hypoxic conditions. In the highlands, the administration of NIT had an effect in the presentation of ASC in a proportion control/treated of 2 to 1. In this project 2 experiments were done with chickens of Cob-Vantress line, one experiment was in the coast (Lima), and the other one was in a 3,200 meters high above the sea (IVITA-MANTARO), in both places were divided in two groups, one with the therapy (NIT 0.1% in water for consume) and other group as a control. The results in the coast show a high concentration of plasmatic NIT in the group with the therapy against the control group, beside any ascitic case was found. The results in the highlands were deciding because in the control group 48 ascitic cases were found from 100 chickens, against 25 ascitic cases from 100 chickens in the group with the therapy, demonstrating that the therapy with NIT played a preventive role in the development of ASC acting as depressor of weight. The reduction of weight in the groups with the therapy was maybe caused for the experimental dose of NIT in the water for consume. The conclusion is that the therapy with NIT in a concentration of 0.1% in water for consume produced, in the highlands, a depressor effect of weight in the treated group and showed a proportion of 2 to 1 in the presentation of ascitic cases in the group control against the group with the therapy respectively.

Key Words: NIT= nitrite, NO= Nitric Oxide, XO= Xantine Oxidase,
ASC= Ascitic Syndrome in Chickens.

I. INTRODUCCIÓN

El Síndrome ascítico en pollos (ASC) es un problema que afecta la explotación avícola en altura, ocasionando hasta un 40% de mortalidad (Hall, et al 1967, Maxwell et al 1986). Se han realizado estudios a fin de establecer la causa y la posible solución (Angulo, et al 2004c)

Se ha demostrado que la hipoxia existente en altura juega un rol fundamental en el desencadenamiento del ASC. Y se descubrió un compuesto químico involucrado en este proceso, el Oxido Nítrico (NO); este compuesto actúa en condiciones normales como un relajante de la musculatura lisa de los vasos sanguíneos permitiendo que se produzca un mayor aporte de oxígeno a los tejidos, pero para la producción del NO es necesario oxígeno (Moncada et al.1991), el cual es pobre en condiciones de altura.

La enzima Oxido Nítrico Sintasa cataliza la conversión de L- arginina en citrulina y NO. Existen tres isoformas de esta enzima; La nNOS (neuronal), o tipo I presente mayormente en células neuronales; la eNOS (endotelial) o tipo III presente en mayor cantidad en los vasos sanguíneos, específicamente en el endotelio; ambas son Ca^{2+} y calmodulin dependientes, mientras que la tercera la iNOS(inducible) o tipo II, es independiente. La eNOS al igual que todas las isoformas, cataliza la conversión de L- arginina en citrulina y NO (factor relajante de la musculatura lisa de los vasos sanguíneos), pero para realizar este proceso es necesario oxígeno y NADPH (Moncada et al.1991). Por ello, en condiciones de altura al existir menor presión de oxígeno, los niveles del NO disminuyen (Odum TW 1993, Angulo, et al 2004c) y al no poder suplir estos requerimientos se desencadena todo un trastorno circulatorio conllevando a una mayor exigencia del corazón.

El NO es una molécula muy pequeña que puede difundirse fácilmente a través de las membranas celulares, y es un importante mediador de procesos fisiológicos y patológicos. El NO se metaboliza rápidamente a nitritos y nitratos ya que su vida media es muy corta (Angulo, et al 2004c, Václav Hampl and Jen Herget 2000).

El NO producido por la eNOS ejerce su acción en la célula endotelial activando la enzima guanil ciclasa la cual convierte GTP en GMPc, esta a su vez es causante de la relajación del vaso sanguíneo, y además inhibe la agregación plaquetaria (Blackman, 2000)

La hipoxemia, producida en altura, puede iniciar procesos que inhiben la fosforilación oxidativa que induce vasoconstricción de las arterias pulmonares, aumentando la presión arterial pulmonar (Maxwell et al 1986, Julian 1993a). Todos estos factores contribuyen a que el ave desarrolle ascitis y en la mayoría de los casos la muerte. Factores intrínsecos como las prostaglandinas, tromboxanos, lecutrienos y citoquinas inflamatorias como interleuquina 1 beta (IL-1 β), factor de necrosis tumoral 1 alfa (TNF-1 α), proteína inflamatoria de macrófago 1 alfa (MIP-1 α) decrecen la producción de NO (Raychaudhuri et al., 1999), así mismo la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) bloquean la vasodilatación dependiente de endotelio, al destruir al NO y bloquear su efecto benéfico y protector de la pared vascular (Taddei et al., 2000).

Endotelinas, leucotrienos, tromboxanos, factor inductor de hipoxia 1 (HIF), respuesta de crecimiento temprano 1 (Egr-1), tienen la capacidad de modular la expresión de genes que actúan en la remodelación de la matriz extracelular y del propio músculo liso de las arterias pulmonares específicamente (Yan et al., 2000).

La hipertensión pulmonar origina un trastorno circulatorio en el cual ocurre un retorno sanguíneo al corazón y por ende, como un mecanismo compensatorio, una hipertrofia ventricular derecha (Arce et al 2002, Currie 1999). Estos procesos sumados al aumento de la viscosidad de la sangre por un incremento de los eritrocitos, desarrolla el cuadro de Ascitis (Currie 1999, Moncada et al.1991). Cabe mencionar que este cuadro no sólo se produce en condiciones de altura, sino que en crías a nivel del mar también origina mortalidad y limita la explotación al máximo (Julian 1993a), y la explicación a esto, es la exagerada manipulación genética del ave.

Zhi zhang (1998) demostró que bajo condiciones de hipoxia el NO es producido independientemente de la acción de las NOS, y que provenía de nitrito el cual es reducido a NO por una enzima, la XANTINO OXIDASA (XO), que tiene estructura similar a las enzimas reductoras bacteriales de nitrito.

Esta reacción redox requiere de NADH como un donador de electrones, pero es oxígeno independiente, por esto en condiciones de hipoxia el NO puede ser producido, pero al consumirse las reservas de nitrito en el organismo su producción disminuye, por tal motivo una terapia de nitrito podrá satisfacer los requerimientos de NO.

En el presente estudio se trata de establecer la base científica para un tratamiento que aporte NO al ave administrando Nitrito de Sodio (0.1%) en agua de bebida y se pueda prevenir el desarrollo del ASC en condiciones de altura.

II. REVISIÓN BLIOGRÁFICA.

2.1 SINDROME ASCÍTICO.

La ascitis de tipo hipóxico se presenta predominante en la explotaciones avícolas ubicadas en zonas por encima de los 1300 m.s.n.m. (Peacock et al 1990), pero puede presentarse en zonas de baja altitud cuando existen situaciones que generen una deficiencia de oxígeno en el interior de los galpones por mala ventilación y/o reemplazo del oxígeno por gases como dióxido de carbono y amoníaco (Hernández, 1986). El ASC es causado por varios factores, dentro de ellos la baja presión parcial de oxígeno y el frío predominante en áreas de altura (Peña et al, 1992), y se caracteriza por el incremento de la resistencia al flujo sanguíneo en la circulación pulmonar, produciendo una hipertensión pulmonar, con aumento del gasto cardiaco, congestión pasiva de la circulación de retorno, hipertrofia del ventrículo derecho, hidropericardio, en la mayoría de los casos ascitis, falla cardiaca y muerte (Peacock et al 1990, Peña et al, 1992, Moreno et al, 1996).

La presentación de la enfermedad en pollos de carne es a cualquier edad, sin embargo, su presentación aumenta en forma abrupta y continúa a partir de la tercera semana del período de engorde hasta el final del mismo. En el caso de la producción avícola a nivel del mar o a bajas alturas el síndrome ascítico es causado por una hipertensión pulmonar que puede ser atenuada por la restricción de la tasa de crecimiento (Julian, 1993b).

Debido al constante mejoramiento genético y la obtención de nuevas líneas de pollo de crecimiento rápido se incrementó del metabolismo basal, lo cual elevó la demanda de oxígeno en el organismo. Los sistemas cardiovascular y pulmonar del ave no son capaces de proveer suficiente transporte e intercambio de oxígeno y dióxido de carbono (Moreno et al, 1996).

Una de las causas que desencadenan la presentación del síndrome ascítico, es el desbalance que existe entre la tasa de crecimiento corporal del pollo de engorde y la

viscosidad sanguínea producida por una lenta maduración de los sistemas fisiológicos responsables de sostener esta tasa de crecimiento. En particular, el sistema cardiovascular no se desarrolla a un ritmo acorde con el que lo hacen los tejidos demandantes (Arce, 1991, Berger, 1992).

Estructuralmente el corazón del ave presenta una pared delgada en el ventrículo derecho y una válvula atrio ventricular derecha de tipo muscular lo cual permite inducir una falla cardíaca rápidamente. Los pulmones de las aves están firmes y fijados a la cavidad torácica, los cuales no se expanden con el ingreso de aire al pulmón. Los capilares sanguíneos aéreos pulmonares forman una estructura rígida que permite una expansión mínima de los capilares sanguíneos cuando es requerido un mayor flujo de sangre. El aire es movido a través de movimientos abdominales y pulmonares con movimientos dentro y fuera de los sacos aéreos. La anatomía y fisiología del sistema respiratorio son importantes en la susceptibilidad de pollos de carne a hipertensión pulmonar. El tamaño pequeño, alto peso de la masa corporal, la presión que ejerce el contenido abdominal sobre los sacos aéreos y el pequeño volumen comparado al peso corporal están involucrados en el incremento de la incidencia del síndrome ascítico (Julian, 1993a).

Por ello, el síndrome ascítico es el resultado de la incapacidad del pollo de engorde para abastecer la alta demanda de oxígeno, que es necesaria para el mantenimiento de la elevada tasa de crecimiento (Odom,1993); siendo el desencadenamiento de tipo multifactorial, en donde están involucrados aspectos genéticos, nutricionales, tóxicos, sanitarios y ambientales (Berger,1992; Scheele et al,1992).

2.2 CUADRO FISIOPATOLÓGICO DEL SÍNDROME ASCÍTICO.

En condiciones de hipoxia ocurren una serie de eventos interrelacionados entre sí que conducen a un trastorno circulatorio, en la cual el desencadenante es el menor ingreso de oxígeno, debido a condiciones hipoxicas, como ocurre en la altura. El

oxígeno es esencial para la producción de ATP durante la respiración aeróbica, esto es posible ya que las células son muy sensibles a los cambios en el contenido de oxígeno o la tensión de la misma. Las células glomosas del cuerpo carotídeo, cuerpo neuroepitelial de la mucosa aérea y las células de la vasculatura pulmonar responden muy rápidamente y exhiben respuestas fisiológicas cuando son expuestas a bajas tensiones de oxígeno (O'Brij y Peacock, 1998). La frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria y gasto cardíaco se incrementan para tratar de mantener la tensión de oxígeno arterial y una adecuada oxigenación a los tejidos (Sidi et al., 2006).

En la exposición a la hipoxia se altera la actividad de los canales de Potasio (K⁺) de las células musculares lisas, cerrando uno o más tipos de canales de K⁺ que están usualmente abiertos bajo condiciones de normoxia (Dumas et al., 1999); esta inhibición de canales de K⁺ puede provocar la despolarización de la membrana y el aumento de la concentración de Calcio citoplasmático [Ca²⁺]_c lo que ocasiona la contracción de las células musculares lisas pulmonares, que se manifiesta como hipertensión pulmonar (Navarro, 2005, Korovkina, 2002).

Muchos autores afirman que la hipoxia ocasiona en la mitocondria de las células musculares lisas un aumento de la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) quienes estarían comprometidos con la inhibición de los canales de K⁺ en las células musculares lisas ocasionando vasoconstricción (Waypa et al., 2001).

Las ROS pueden ser generadas por el sistema nicotinamida adenina dinucleotidofosfato (NADPH) oxidasa, la xantina oxidasa, la óxido nítrico sintasa (NOS) o la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Además de radicales libres como el superóxido, la mitocondria también produce óxido nítrico (NO), el cual es un vasodilatador, y anhídrido carbónico (CO₂); por lo tanto, la estimulación de la producción del superóxido por condiciones hipóxicas puede llevar a la formación de especies reactivas de Nitrogeno (RNS) tales como el peroxinitrito (ONOO⁻) y la nitrosoperoxocarboxilato (ONOOCO₂), que son productos de la reacción del NO con el superóxido y del NO con el CO₂ respectivamente, todo esto puede llevar a una mayor

disfunción mitocondrial y por lo tanto disfunción endotelial a través de la oxidación secundaria y la nitración (Ballinger et al., 2002).

La hipertensión está asociada a procesos de bloqueo de la vasodilatación dependiente de endotelio, y es mantenida predominantemente por la producción de las ROS, quienes pueden destruir al NO, bloqueando su efecto benéfico vasodilatador y protector de la pared vascular (Taddei et al., 2000). En otras especies, la hipertensión arterial pulmonar en neonatos inducidos por hipoxia son por múltiples interrupciones de la vía del NO, quien es importante para la regulación de la vasodilatación pulmonar neonatal (Berkenbosch et al., 2000).

Animales sometidos a hipoxia presentan un incremento del RNAm para factor inductor de hipoxia (HIF-1), induciendo su producción en el endotelio arterial pulmonar, músculo liso, epitelio bronquial, macrófagos alveolares, epitelio alveolar y endotelio de la microvasculatura. El HIF-1 está relacionado con la patogénesis de la hipertensión arterial pulmonar, al regular la producción de endotelina 1 (ET-1) y la transcripción del gen de la eritropoyetina (EPO) (Yu et al., 1998; Semenza, 2000).

En la hipoxia se ha encontrado un incremento de los niveles plasmáticos de la ET-1 y del ARNm de la preproendotelina-1 (Earley et al., 2002). Este potente vasoconstrictor contribuye al desarrollo de la hipertensión pulmonar crónica cuando se une a receptores-A de ET en las células de músculo liso vascular, ya sea ésta de origen endógeno o administrado por vía intravenosa a dosis farmacológicas (Eddahibi et al., 1995). La ET-1 también ejerce un efecto vasodilatador autocrino por incremento de la actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) a través de receptores B de ET en células endoteliales vasculares (Zhang et al., 1999).

Debido a la exposición a la hipoxia crónica y a la altura, existe un aumento en la producción de EPO por las células intersticiales peritubulares renales, que tiene por función activar la masa de los glóbulos rojos y la concentración de hemoglobina (Ge et al., 2002). La policitemia es un mecanismo compensatorio para mantener el reparto de oxígeno durante la permanencia en la altura, pero cuando es excesiva, se asocia con el

síndrome ascítico y el mal de altura en otras especies. Después de la exposición a la altura, hay un aumento en el hematocrito incrementándose la viscosidad sanguínea, hasta tal punto que el flujo de sangre a los tejidos se compromete (Ebert y Bunn, 1999).

Un severo incremento del número de glóbulos rojos, se asocia frecuentemente con la hipertensión arterial, resultando en complicaciones cardiovasculares severas (Moreno y Hernández, 1996).

En la hipoxia por altura se liberan también otras sustancias vasoconstrictoras. Muchas de las cuales son producidas en el endotelio y metabolizadas in situ. Estas sustancias provienen del metabolismo del ácido araquidónico (AA) en la célula endotelial la cual es catalizada principalmente por las enzimas ciclooxigenasas (COX) y lipooxigenasas (LO), los cuales son generadores de una gran variedad de eucosanoides, dentro de los cuales tenemos las prostanglandinas (PGs), tromboxanos y leucotrienos que regulan el tono vascular (Serhan y Oliw, 2001).

Los eucosanoides productos del AA al parecer modulan la vasoconstricción pulmonar en hipoxia. Las células vasculares endoteliales liberan varios eucosanoides por efecto de la hipoxia (Holden et al., 1992). La COX cataliza los pasos comprometidos en el metabolismo del AA hasta la formación de PGs, tales como la prostaglandina D2 (PGD2), prostaglandina E2 (PGE2), prostaglandina I2 o prostaciclina (PGI2), la prostaglandina F2 α (PGF2 α) y los tromboxanos. Estos dos últimos tienen efectos vasoconstrictores (Adams, 1998; Meade et al., 1996). La liberación del AA a partir de los fosfolípidos de la membrana es mediada por la enzima fosfolipasa A2 (PLA2), siendo la PLA2 citosólica la más relacionada a la hipertensión pulmonar arterial. (Ichinose et al., 2002).

Las PGs tienen efectos vasodilatadores y vasoconstrictores y es debido a la adenosina monofosfato cíclico (AMPC) en el citosol, cuando este aumenta se produce vasodilatación y cuando disminuye se produce vasoconstricción (Haroun et al., 2004).

En casos de hipoxia crónica la angiotensina II (ANGII) potente vasoconstrictor proveniente del sistema renina-angiotensina, y una angiotensina local, modulan los

canales de K⁺ y canales de calcio dependientes de K⁺ (Shimoda et al., 1999). La depresión de canales de potasio por hipoxia causa una elevación de calcio citosólico, quien puede ser suficiente para generar una contracción muscular (Ward et al., 1999).

Hipoxia también induce respuestas adaptativas complejas, siendo una de éstas la inducción del gen que gobierna la producción de Egr-1 (respuesta de crecimiento temprano) y el antígeno del factor tisular en macrófagos pulmonares, músculo liso vascular y bronquial. Este tiene la capacidad de modular la expresión de genes involucrados en la remodelación de la matriz extracelular y del propio músculo liso (Yan et al., 2000).

En las enfermedades pulmonares, se sabe que los macrófagos incrementan la inducción y producción de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6 Y TNF α), por la vía de NF-Kappa β (Drumm et al., 1998). Hipoxia aguda induce el incremento de la actividad de Factor Nuclear Kappa (NF-K β); asimismo los macrófagos sometidos a hipoxia incrementan el bandeo de RNAm para TNF, IL-1 e IL-1ra, por lo tanto en hipoxia se incrementa la liberación de citoquinas TNF α e IL-1 β esto no requiere síntesis de nuevas proteínas (Hemple et al., 1996; Ndengele et al., 2000). La activación de la IL-6, citoquina con propiedades antiinflamatorias, puede ser el mecanismo limitante de la inflamación en casos de isquemia e hipoxia (Yan et al., 1995). En macrófagos pulmonares la producción de citoquinas inflamatorias como IL-1 β y TNF α decrecen la producción de NO (Raychaudhuri et al., 1999).

En condiciones de hipoxia, hay una menor concentración de oxígeno en los tejidos, que desencadena hipoxia celular en los capilares aéreos pulmonares, ocasionando una rápida vasoconstricción arteriolar, lo cual desplaza el flujo sanguíneo desde las regiones menos ventiladas a las mejor ventiladas, provocando varias reacciones, entre ellas un aumento del hematocrito, lo cual hace que la sangre sea más viscosa, por lo que el corazón aumenta su trabajo para impulsar la sangre hacia los pulmones. El corazón no es un órgano diseñado para trabajar a elevadas presiones, por lo que ocurre una hipertrofia ventricular derecha y después una flacidez del tejido, aunado al bloqueo en el tránsito sanguíneo por el daño (la malfunción primaria puede

ser cardíaca o pulmonar), produce una elevación de la presión sanguínea a nivel de la arteria pulmonar y un aumento en la actividad muscular del ventrículo derecho. El incremento de la presión sanguínea se transmite progresivamente a los capilares pulmonares causando edema pulmonar, que disminuye aún más la capacidad de intercambio gaseoso. La prolongación de este proceso provoca una paulatina dilatación del ventrículo derecho que finalmente ocasiona fallas en la válvula auriculo-ventricular derecha y permite el retorno venoso a las cámaras anteriores, incrementando la presión que soporta la aurícula derecha. Frente a esta falla cardíaca derecha, generalmente se produce un aumento en la presión hidrostática de todo el sistema venoso (congestión crónica pasiva), los órganos se congestionan (especialmente el hígado), aumenta la presión y se produce la extravasación y edema generalizado que se traduce finalmente en hidropericardio y ascitis (Aree et al, 1987b).

En pollos con síndrome ascítico se observan cambios en el comportamiento como letargia, postración en posición de dormir, respiración forzada y plumaje parcialmente erizado, mala nutrición como consecuencia de la anorexia y consumo inadecuado de alimento lo cual también se puede atribuir a una desbalance en el metabolismo tisular. Hay una alta mortalidad, siendo más susceptibles los pollos de 25 días; esto se relaciona al hecho de que estos animales tienen un mayor consumo de oxígeno por gramo de peso vivo que los pollos de mayor edad. (Ploog, 1999).

El gasto cardíaco en pollos hipóxicos es mayor que en pollos controlados a nivel del mar. Éste incremento en el gasto cardíaco se relaciona con un significativo incremento en el ritmo cardíaco que no altera el volumen sistólico, y parecería ser regulado por la demanda de sangre oxigenada por los órganos del cuerpo y el ajuste del gasto cardíaco puede deberse al intento del organismo por compensar la disminución en la saturación de oxígeno (Ploog, 1999).

2.3 ÓXIDO NÍTRICO.

El NO es un potente mediador biológico en una variedad de tejidos. Participa en varias funciones fisiológicas como relajación del músculo liso, inhibición de la agregación plaquetaria dentro de la microvasculatura, regulación de la neurotransmisión y esta implicada en procesos proinflamatorios e inflamatorios en el pulmón (NHLBI, 1999)

El NO es un radical libre, con un electrón impar, molécula no cargada que puede difundir fácilmente a través de las membranas celulares. Sin embargo como radical libre su reactividad es muy débil. Esta pobre reactividad, combinada con su liposolubilidad, le permite ser difusible. Los radicales libres o especies reactivas del oxígeno que reaccionan con el NO, son los metales de transición y el súper óxido (O_2^-), resultando en intermediarios que pueden tener efecto inflamatorio (Ohata et al., 2000).

2.3.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL NO.

El Óxido Nítrico (NO) es un gas simple formado por un átomo de oxígeno y un átomo de nitrógeno, los dos elementos más comunes de la naturaleza. Tiene un peso molecular de 30,006 daltons. Una densidad relativa a 21°C de 1,036, un volumen específico de 0,81 m³/Kg, una temperatura de ebullición de -151,8°C, es considerada como sustancia venenosa de clase A, posee una pureza mínima de 98,5%. Es inestable termodinámicamente a temperatura ambiente, en estado gaseoso no tiene tendencia a formar dímeros y en estado líquido es de color azul y forma dímeros. Es altamente tóxico, generando edema pulmonar de 100 a 150 p.p.m. durante 30 a 60 minutos y de 200 a 700 p.p.m. durante 5 a 8 horas edema pulmonar fatal (Adams, 1994; Rubin, 1996). El NO posee una vida media corta (3 a 5 segundos) después de la cual se degrada a compuestos de desecho como nitritos y nitratos (Lowenstein, 1994).

La presencia del electrón desapareado permite al NO interactuar rápidamente con otros átomos que son abundantes en los sistemas biológicos, tales como el nitrógeno (N) y el azufre (S) que forman parte de las proteínas o especies reactivas de oxígeno, la

unión del NO a las proteínas, u otras moléculas, se llama nitrosación, y este proceso es la base química que permite al NO ejercer diversas funciones en los organismos

2.3.2. BIOSINTESIS Y FUNCIÓN DEL OXIDO NITRICO.

El NO se sintetiza en varios tipos celulares (como células endoteliales, macrófagos y tejidos nerviosos preferentemente) a partir del grupo amino terminal de la L-Arginina, formándose también una molécula de L-Citrulina (Moncada et al, 1989). La síntesis de NO a partir de L-Arginina está catalizada por la óxido nítrico sintasa (NOS). Existen al menos tres isoformas presentes en los diferentes tipos celulares (eNOS presente en células endoteliales, iNOS isoforma inducible presente en macrófagos y células mesenquimales y nNOS presente en tejido nervioso) (Forstermann et al, 1991).

La reacción del NO está catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), y requiere de la presencia de tres cosustratos: L-arginina, NADPH y O₂ y de cinco cofactores: Flavin mononucleótido (FMN), flavin adenina dinucleótido (FAD), calmodulina, hemo y tetrahidrobiopterina (TBH) (Schmidt y Walter; 1994).

El NO tiene acción vasodilatadora, favorece el desarrollo de los procesos inflamatorios, dependiendo de diversos estímulos tales como: vasodilatadores endógenos (histamina, bradicinina, trombina, ATP, acetilcolina, sustancia P), hipoxia aguda, aumento de onda pulsátil del flujo sanguíneo y de la presión intravascular, angiotensina II (AG-II) y endotelina I (ET-1) (Carville et al, 1997). Además participa en diversos mecanismos como activación de macrófagos y en procesos de neurotransmisión (National Heart, Lung and Blood Institute - NHLBI.1994).

El NO también es secretado por plaquetas, numerosas neuronas cerebrales y macrófagos alveolares (Perez et al, 1997); las cuales se encuentran incrementados en altura en comparación con el nivel del mar (Blackman et al, 2000).

La producción de NO tiene un papel fundamental en la regulación del tono arterial (Blackman et al, 2000) y la presión arterial pulmonar (Perez et al, 1997). En venas su efecto es menor. Esta producción de NO por el epitelio de las vías aéreas es dependiente del nivel de oxígeno inspirado (Ide et al, 1999).

Una vez producido el NO, difunde hacia el músculo liso de la arteria pulmonar para activar la guanilato ciclasa y producir 3' 5' monofosfato cíclico (GMPc). Al incrementar el GMPc en las células del músculo liso de la arteria pulmonar se activa una kinasa sensible al GMPc la cual fosforila un canal de k dependiente de Calcio llevando a la hiperpolarización. Además se disminuye la $[Ca^{2+}]_c$ que conlleva a la vasodilatación (Hintze et al., 1999; Hampl y Herget, 2000). El NO es el más potente vasodilatador entre las sustancias vasoactivas mediadoras de inflamación (Ohata et al, 2000). Éste inhibe la agregación plaquetaria y la proliferación del músculo liso y decrece la expresión de moléculas proinflamatorias por el endotelio. Sin embargo, puede ser rápidamente inactivado por el radical superóxido que se encuentra en cantidades significativas en el endotelio (Brovkovich et al, 1999).

Hay diferencias en los resultados si ante un desafío hipóxico agudo hay un aumento o disminución de la liberación de NO (Dumas et al., 1994; Fike et al., 1998). Actualmente la mayor cantidad de estudios está focalizado en la regulación del NOS. La ausencia del eNOS o tipo III ha sido asociada a una leve hipertensión pulmonar en estados de normoxia, sugiriendo que el NO liberado podría participar en el bajo tono de la circulación pulmonar durante la normoxia (Steudel et al., 1997). En una hipoxia crónica moderada la hipertensión pulmonar fue más severo en deficiencia de eNOS; sin embargo cuando la hipoxia es muy severa el eNOS no es fisiológicamente efectivo (Fagan et al., 1998) y existe un incremento de la expresión de iNOS o tipo II (Raffestin et al., 2002).

2.5. GENERACIÓN DE “NO” POR XANTINO OXIDASA A PARTIR DE NITRITO

La síntesis de NO es ahora bien conocido como resultado de la oxidación de la L- arginina por una familia de NOS, las cuales de acuerdo a su ubicación celular producen NO. Sin embargo bajo condiciones de hipoxia este mecanismo de síntesis de NO puede ser afectado y la síntesis de NO es formado por un mecanismo independiente de NOS. Fue ahí donde se propuso a la enzima XANTINO OXIDASA (XO) como la responsable de generación de NO independiente de NOS. Zhi zhang y col (1998), demostraron que a partir de la reducción de NITRITO (NIT) se obtiene NO debido a la acción de XO la cual actúa bajo condiciones de hipoxia cuando el sistema dependiente de oxígeno de las NOS no puede actuar (Zhi zhang et al, 1998).

Estructuralmente la XO es similar a enzimas bacterianas reductoras de nitrito, Zhi zhang y col encontraron que enzimas bacteriales purificadas y tejidos conteniendo XO catalizaban la reducción de nitrito a NO, como modo de comprobación se utilizó un marcador químico-luminiscente de NO el cual demostró su procedencia de acuerdo a la enzima que la producía, todo esto bajo condiciones de hipoxia (Zhi zhang et al, 1998).

Esta reacción redox requiere NADH como donador de un electrón, de modo oxígeno independiente. La reducción de NIT tiene lugar en el centro molibdeno de la XO mientras que NADH es oxidado en la ubicación FAD, el enlace de heparina de XO causa un incremento en la catálisis de la reducción del NIT. La generación de NO por la catálisis de la XO puede ser importante en la redistribución del flujo sanguíneo a tejidos isquémicos tan igual como la vía NO-NOS, desde que NIT y NADH han mostrado una elevación en tejidos hipóxicos (Pozo, 1998).

El NO, un radical libre, esta envuelto en muchos procesos fisiológicos y patológicos, como la vasodilatación, inhibición plaquetaria, neurotransmisor y en el mecanismo de defensa. Ésta bien conocida vía de la L-arginina ha sido estudiada con mayor énfasis en células mamíferas. Sin embargo recientes investigaciones muestran al miocardio generando NO en una manera dependiente de nitrito, e independiente de

NOS lo cual sugiere un mecanismo alternativo de la ya conocida. Es claramente concebible que la eficiencia de la generación de NO por NOS vía L-arginina será drásticamente reducido cuando los suplementos de oxígeno son limitados, ya que tanto oxígeno como L-arginina son substratos indispensables para la síntesis de NO de forma clásica (García et al, 1998).

Nitrato reductasa y nitrito reductasa, las dos metaloenzimas envueltas en la acción catalizadora de algunas bacterias y plantas, catalizan la reducción de nitrato a nitrito y de nitrito a NO respectivamente. Hasta hace muy poco no se habían identificado nitrato y nitrito reductasa en células mamíferas, aunque ya había sido reportada la acción de la XO en la reducción de nitrato a nitrito (Zhi zhang et al, 1998).

XANTINO OXIDASA (XO) es un homodímero con cada subunidad conteniendo un molibdeno, un dinucleótido Flavin adenina (FAD) y dos centros hierro sulfuro (Fe/S). Es bien conocido que XO cataliza la oxidación de (hipo) xantina que puede producir especies reactivas de oxígeno como H₂O₂ y O₂⁻ durante un cuadro de hipoxia (Zhi zhang et al, 1998).

El mecanismo molecular en la formación de la reacción puede ser descrita brevemente como sigue: el Mo (VI) de la XO rompe el enlace de la xantina C8-H aceptando 2 electrones de xantina, dándolo al Mo (IV); la transferencia de un átomo de oxígeno desde la unidad de molibdeno a C8 produce ácido úrico. Concomitantemente la conversión de Mo (IV) a Mo (VI) resulta en la transferencia de 2 electrones a FAD central, formando FADH₂. Este FADH₂ es luego reconvertido a FAD reduciendo oxígeno molecular a H₂O₂ y O₂ (Zhi zhang et al, 1998).

Sin embargo es menos conocido que XO puede además catalizar la oxidación de NADH para generar especies reactivas de oxígeno; aunque el detallado mecanismo no ha sido aún definido, es probable que NADH actué como un substrato reductor en el FAD central más que el sitio de Mo y done su electrón a O₂ formando O₂⁻ (Zhi zhang et al, 1998).

XO y nitrato reductasa comparten similitud estructural, ambos son molibdeno enzimática (molibdenoenzimas) y contienen FAD y Fe/S agrupado. Esta estructura similar enzimática llevo a Zhi Zhang y col. a demostrar que XO es capaz de producir NO a partir NIT bajo condiciones de hipoxia en donde la vía clásica dependiente de oxígeno no puede llevarse a cabo (Zhi zhang et al, 1998).

El NIT es un radical univalente NO₂ o un compuesto que lo contenga, tal como una sal o un éster de ácido nitroso (<http://www.lenntech.com>).

Cuando el nitrito entra en el flujo sanguíneo, reacciona con la hemoglobina y forma un compuesto llamado metahemoglobina. Este compuesto reduce la capacidad de la sangre para transportar oxígeno. El nivel de oxígeno disminuye, y en el caso de bebés muestran síntomas de una enfermedad llamada metahemoglobinemia, también conocida como “la enfermedad de los bebés azules” en caso de humanos (<http://www.lenntech.com>).

El síntoma más obvio de la metahemoglobinemia es la aparición de un tono azulado en la piel, particularmente alrededor de los ojos y boca. Si se descubre con rapidez, esta enfermedad puede ser tratada exitosamente con una inyección de azul de metileno, que transforma la metahemoglobina de nuevo a hemoglobina. La enfermedad es extremadamente grave si no se trata: la muerte tiene lugar cuando el 70 por ciento de la hemoglobina del cuerpo ha sido transformada a metahemoglobina (<http://www.lenntech.com>).

III. METODOLOGÍA DE TRABAJO

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Farmacología y Toxicología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM (nivel del mar) con una presión parcial de oxígeno de 157 mmHg y presión barométrica de 750 mmHg, y en el Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA), del distrito de El Mantaro, provincia de Jauja a una altura de 3,320msnm. Con una presión barométrica de 510 mmHg. y presión parcial de oxígeno de 107 mmHg.

3.2. NÚMERO DE ANIMALES.

Se utilizaron 320 pollos de carne de la línea Cobb-Vantress. 120 pollos criados a nivel del mar (60 control y 60 tratados con NITRITO) en el período de Abril-Mayo de 2006 y 200 pollos criados en altura a 3320msnm (100 control y 100 tratados con NITRITO), en el período de Agosto-Setiembre de 2006. La duración de las crías fue de 6 semanas

3.3. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.

3.3.1. MATERIALES DE LABORATORIO.

1. Materiales e Instrumentos.

Comederos.

Bebedores de plástico.

Alimento para pollos de carne de Purina.

Jaulas acondicionadas.

Tijeras.
Marcadores.
Viruta.
Escobas.
Cortinas.
Balde.
Tubos de ensayo.
Pipetas 1ml, 2ml, 5ml, 10ml.
Micropipetas 20-100 μ l, 30-300 μ l, 100-1000 μ l.
Gradillas.
Cinta Maskingtape.
Plumones indelebles.
2 pinzas de disección simple.
2 tijeras mayo recta y curva.
1 pinza de disección con dientes de ratón
Bandejas.
Pabilo.
Mallas metálicas.
Cuaderno de notas.

2. EQUIPOS.

Balanza de platillos.
Balanza analítica Metler.
Calefactores.
Espectrofotómetro UV-VIS LaboMed., Inc.
Centrífuga Adams.
Termómetro ambiental.

3. REACTIVOS.

Reactivo de Griess A: Ácido sulfanílico 1% en ácido fosfórico al 5%.

Reactivo de Griess B: N-1-Naftiletildiamina al 0.1% en agua destilada.

Nitrito de Sodio 0.1%.

Cloruro de sodio (NaCl).

Formol 10%.

Sulfato de zinc (ZnSO₄) 30%.

Hidróxido de sodio (NaOH) 1.0M

Heparina 5000 UI.

Agua destilada

Etanol de 96%.

Zinc metálico en polvo.

3.4 ADMINISTRACIÓN DE NITRITO.

A los grupos tratados se les suministro NIT durante las 6 semanas en forma continua en el agua de bebida a una concentración de 0.1% (1g/L).

Los animales recibieron alimento concentrado comercial según la etapa de crecimiento, inicio, crecimiento y engorde, según los estándares de la línea.

El alimento y el agua fue administrado en forma ad libitum, la temperatura fue controlada con un termómetro ambiental y también se controló la ventilación del ambiente.

3.5 TOMA DE MUESTRA.

La toma de muestra fue semanal durante las 6 semanas de crianza. El número de animales muestral a nivel del mar fue de 10 pollos por cada grupo y en la altura de 7 pollos por cada grupo, a los cuales se les pesó y sacrificó por decapitación; y se tomo la sangre para medir los niveles de nitrito plasmático mediante el método de Griess.

3.5.1 Procesamiento de la muestra.

La sangre fue colocada en tubos previamente heparinizados, luego fueron centrifugadas a 3500 r.p.m. durante 15 minutos para obtener el plasma; para luego ser desproteínizado en medio alcalino. Las proteínas fueron precipitadas con sulfato de Zinc para obtener un plasma libre de impurezas.

Este plasma fué usado junto con el reactivo de Griess para cuantificar al NO mediante la determinación de nitrito (NO₂⁻) el cual es uno de los dos principales productos de degradación del NO.

El fundamento del reactivo de Griess descansa en una reacción de diazotación. El reactivo de Griess usa sulfanilamida y dicloruro de N-1 naftiletildiamina (NED) bajo condiciones ácidas (ácido fosfórico). Este sistema detecta al NO₂⁻ en una gran variedad de líquidos biológicos y experimentales tales como el plasma, suero y orina y medios de cultivo celular. La sensibilidad a los nitritos depende del medio en que se encuentren.

El reactivo de Griess proporciona al plasma una coloración púrpura claro, el cual es medido mediante el espectrofotómetro. Las lecturas de la absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro digital (Spectrophotometer LaboMed a 546 nm) y fueron referidas a la absorbancia de soluciones de nitrito de sodio tratadas de la misma manera con el reactivo de Griess.

Las muestras (plasma de pollo) determinados en lecturas de absorbancia fueron convertidos a concentraciones en micromolar (μM), con una relación estadísticamente al 99% de confianza. Según, el modelo lineal:

$$\text{ABSORBANCIA} = 0,050625177 \times \text{CONCENTRACIÓN} + 0,003150401$$

3.5.2. Determinación de casos de ascítis.

La determinación de casos de ascítis se realizó en los pollos criados en altura mediante observación de líquido ascítico presente en la cavidad pélvica a la necropsia de los animales que morían durante la crianza y de igual forma a los animales que se tomaron para la toma de muestra.

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se procedió a analizar los resultados de manera descriptiva (promedio, regresión lineal, análisis de varianza) y un nivel de confianza de 95%. Los valores plasmáticos de nitrito (NO_2^-) de cada grupo fueron analizados con la prueba de T-Student, mientras que los valores de casos ascíticos fueron analizados con la prueba estadística de diferencia de proporciones.

IV. RESULTADOS

Análisis de valores plasmáticos de nitrito.

Los resultados a nivel del mar mostraron que los valores plasmáticos de nitrito encontrados en el grupo tratado, fueron estadísticamente mayores ($p < 0.05$) que el grupo control en todas las semanas (Cuadro 1).

En la altura se encontró que los valores plasmáticos de nitrito del grupo tratado fue estadísticamente mayor ($p < 0.005$) al grupo control en todas las semanas (Cuadro 1).

Al realizar la comparación entre ambos grupos controles se observó que el grupo control de nivel del mar fue estadísticamente mayor ($p < 0.05$) al grupo control de altura solo en la cuarta semana, no existiendo diferencia estadística en el resto de las semanas (Cuadro 2).

La comparación de los grupos tratados, mostró que el grupo tratado a nivel del mar fue estadísticamente mayor ($p < 0.05$) en la primera, segunda, quinta y sexta semana al grupo tratado en altura, no existiendo diferencia estadística en la semana tres y cuatro. (Cuadro 2).

Al analizar los pesos podemos apreciar que los pesos en los grupo tratados fueron menores en ambas ubicaciones con respecto a su control, es así que en la costa se encontró diferencia estadística en pesos en las semanas 3, 4, 5 y 6 y en altura se encontró diferencia estadística en las semanas 3, 4 y 5 (cuadro 3 y 4).

Cuadro 1: Doble comparación de valores promedios de nitritos (μM) plasmáticos entre grupo control y tratado a nivel del mar y en altura.

Edad (días)	Nivel del mar		Altura	
	Control $X \pm \text{IC}$	Tratado $X \pm \text{IC}$	Control $X \pm \text{IC}$	Tratado $X \pm \text{IC}$
7	$0.42 \pm 0.14^*$	$25.08 \pm 7.00^*$	$0.75 \pm 0.61^*$	$13.80 \pm 9.55^*$
14	$0.25 \pm 0.12^*$	$18.28 \pm 4.44^*$	$0.38 \pm 0.24^*$	$5.88 \pm 4.05^*$
21	$0.29 \pm 0.06^*$	$15.36 \pm 3.39^*$	$0.36 \pm 0.21^*$	$16.80 \pm 12.21^*$
28	$0.39 \pm 0.2^*$	$20.75 \pm 5.15^*$	$0.11 \pm 0.11^*$	$14.74 \pm 6.49^*$
35	$0.21 \pm 0.22^*$	$25.90 \pm 4.60^*$	$0.13 \pm 0.32^*$	$12.69 \pm 8.23^*$
42	$0.55 \pm 0.63^*$	$18.47 \pm 3.98^*$	$0.40 \pm 0.67^*$	$7.29 \pm 3.91^*$

(*): Diferencia estadística entre grupos tratados versus controles, en ambas ubicaciones por separado.

Cuadro 2: Doble comparación de valores promedios de nitritos (μM) entre grupo control versus control y tratado versus tratado a nivel del mar y en altura.

Edad (días)	Control		Tratado	
	Nivel del mar $X \pm \text{IC}$	Altura $X \pm \text{IC}$	Nivel del mar $X \pm \text{IC}$	Altura $X \pm \text{IC}$
7	0.42 ± 0.14	0.75 ± 0.61	$25.08 \pm 7.00^*$	$13.80 \pm 9.55^*$
14	0.25 ± 0.12	0.38 ± 0.24	$18.28 \pm 4.44^*$	$5.88 \pm 4.05^*$
21	0.29 ± 0.06	0.36 ± 0.21	15.36 ± 3.39	16.80 ± 12.21
28	$0.39 \pm 0.2^*$	$0.11 \pm 0.11^*$	20.75 ± 5.15	14.74 ± 6.49
35	0.21 ± 0.22	0.13 ± 0.32	$25.90 \pm 4.60^*$	$12.69 \pm 8.23^*$
42	0.55 ± 0.63	0.40 ± 0.67	$18.47 \pm 3.98^*$	$7.29 \pm 3.91^*$

Análisis de los pesos

Resultados en Lima.

Cuadro 3. Promedios de pesos semanales en costa

Edad	Cantidad	Peso gr. Grupo Control	Peso gr. Grupo Tratado (NIT)
7 días	10	202	149.1
14 días	10	538	418.3
21 días	10	1000.2(*)	811.4(*)
28 días	10	1684.8(*)	1379.4(*)
35 días	10	2474.8(*)	1867.1(*)
42 días	10	3235.1(*)	2845.3(*)

(*): Diferencia estadística entre los grupos tratado versus control

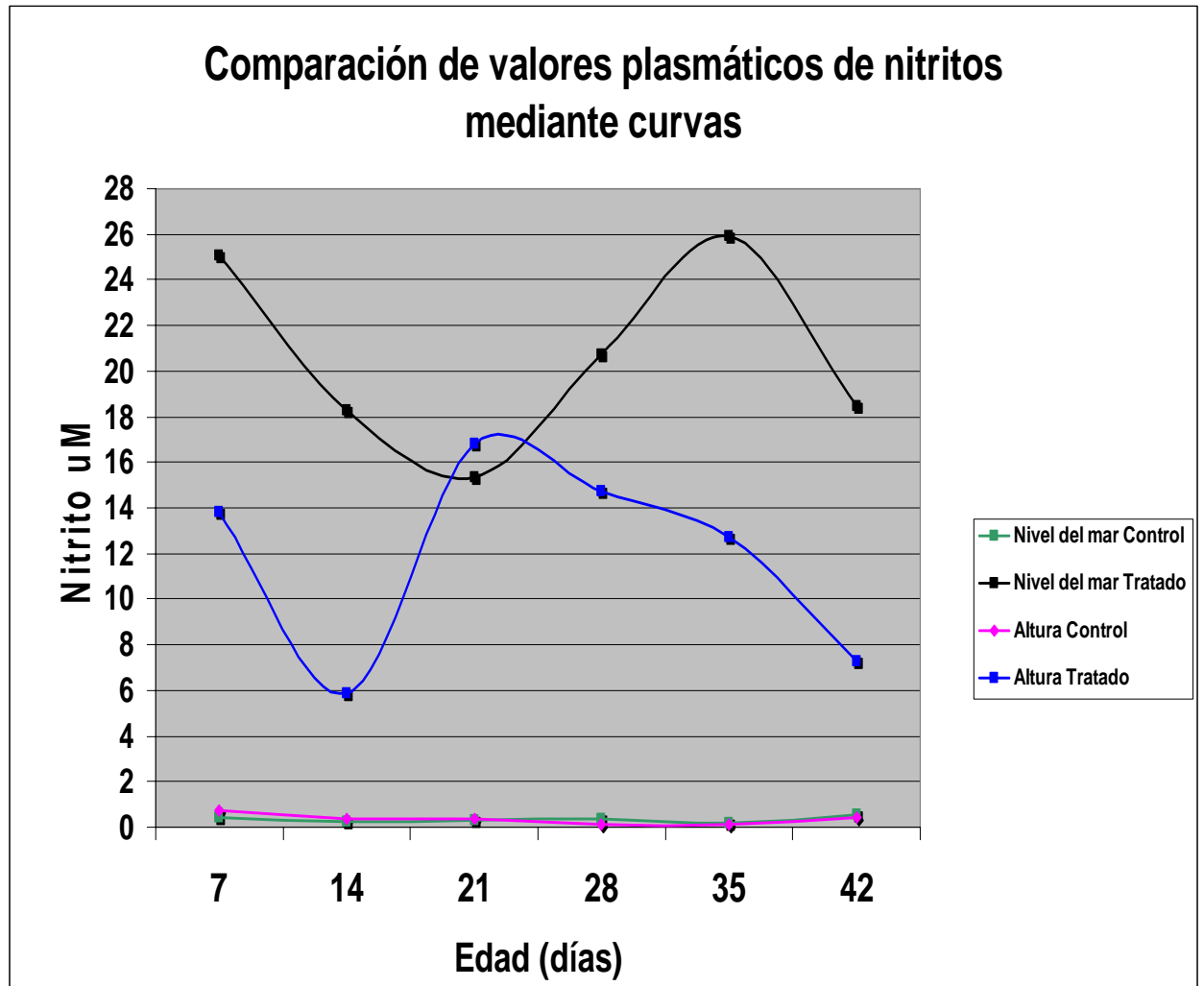
Resultados en altura.

Cuadro 4. Promedios de pesos semanales en altura.

Edad	Cantidad	Peso gr. Grupo Control	Peso gr. Grupo Tratado (NIT)
7 días	07	114.9	91.5
14 días	07	301.2	218.2
21 días	07	539.7(*)	393.8(*)
28 días	07	1069.1(*)	861.6(*)
35 días	07	1587.6(*)	1095.6(*)
42 días	07	1961	1831

(*): Diferencia estadística entre los grupos tratado versus control

Gráfico 1. Comparación de valores plasmáticos de nitritos de todos los grupos.



Evaluación de los casos ascíticos.

A nivel del mar no se encontró ningún caso ascítico, en ninguno de los grupos control y tratado.

En altura si se encontró casos ascíticos en ambos grupos (control y tratado), para esto se anotaron los casos ascíticos encontrados en las aves que murieron durante la crianza (cuadro 5).

Cuadro 5. Casos ascíticos encontrados durante la crianza.

Grupo / Semana	1	2	3	4	5	6	Total
Control	--	6	7	14	11	10	48
Tratado	--	2	6	4	7	6	25

El cuadro 5 muestra los casos ascíticos encontrados durante la crianza, los cuales fueron contabilizados por semana en ambos grupos. Se aprecia que el grupo control presenta mayor número de casos que el grupo tratado, existiendo diferencia estadística mediante la prueba de diferencia de proporciones.

V. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, muestran que los valores plasmáticos de nitritos medidos con el espectrofotómetro son muy altos respecto a sus controles.

Al observar los pesos podemos apreciar claramente que el nitrito ejerció un efecto depresor en la ganancia de peso en los grupos tratados en ambas ubicaciones (cuadro 3 y 4). El nitrito interfiere en el metabolismo de algunas vitaminas y proteínas además se une a la hemoglobina y se forma metahemoglobina, produciéndose anoxia y anemia.

Los resultados obtenidos muestran claramente que el NITRITO (nitrito de sodio administrado al 0.1%) en agua de bebida, causó una depresión en la ganancia de peso y esto evitó la presentación de casos de ascitis. El NIT en condiciones de hipoxia es reducido a NO por la enzima Xantino Oxidasa (Zhi zhang et al, 1998) tal como ocurre en altura, en donde existe un menor tenor de oxígeno, y así se puede dar la vasodilatación necesaria para incrementar el aporte de oxígeno (Ignarro et al, 1987), pero el NIT administrado a razón de 0.1% no fué talvez la dosis ideal puesto que dentro de las observaciones que se hicieron durante todo el experimento se notó que la ganancia de peso en los grupos tratados (NIT) en ambas ubicaciones fue menor respecto al grupo control y esto posiblemente por que el NIT tiene efectos secundarios en el organismo cuando es administrado a dosis experimentales (World Health Organisation – WHO 1962; Simon, 1966).

Haciendo un análisis de los resultados por ubicación, tenemos que a nivel del mar, los valores expresados en el cuadro 1, en la que se comparan los valores plasmáticos de nitritos obtenidos del grupo tratado versus el grupo control, muestran una clara diferencia de valores observando que los valores del grupo tratado son marcadamente mayores con respecto al grupo control, este hallazgo nos pone en evidencia que el NIT administrado (0.1%) en agua de bebida para el grupo tratado, incremento notablemente los valores plasmáticos de nitritos. De igual modo al analizar

los resultados de los valores plasmáticos de nitritos obtenidos en la altura encontramos en el cuadro 1 que los valores plasmáticos del grupo tratado versus el control, mostró diferencia de valores, siendo los valores del grupo tratado marcadamente mayores con respecto al control, evidenciando un patrón similar de diferencia de valores al encontrado en la crianza a nivel del mar.

Al analizar el cuadro 2, en donde se comparan los valores plasmáticos de nitritos entre los grupos controles, costa vs altura y entre los grupos tratados, costa vs altura, se puede apreciar que la comparación de valores entre los grupos controles estadísticamente no presentaron diferencia, salvo en la semana 4 en donde los valores en altura son menores estadísticamente con respecto al de la costa. Al realizar la comparación de valores entre los grupos tratados se encontró diferencia estadística en las semanas: 1, 2, 5, y 6. en las que los valores del grupo tratado en altura fueron menores. Los valores bajos encontrados en altura pone en evidencia que pudo haber ocurrido un consumo del NIT administrado en agua, el cual fue posiblemente reducido por la XO a NO (Zhi zhang et al, 1998), o que se metabolizó de otra manera no esclarecida, pero que si ejerció un efecto depresor en la ganancia de peso y fue ésta depresión la que permito que no se desarrolle el cuadro ascítico.

A nivel del mar, se encontró que los valores de pesos del grupo tratado fueron inferiores respecto al grupo control (cuadro 3), llegando a la sexta semana con un peso de 2.845Kgr. en el grupo tratado vs. 3.235Kgr. en el grupo control. Al realizar la prueba de T-Student se encontró diferencia estadística en las semanas: 3, 4, 5 y 6, esto pone en evidencia que el NIT administrado en agua, esta ejerciendo un efecto en la ganancia del peso, posiblemente debido a la dosis de NITRITO (0.1%), dosis netamente experimental. Por otro lado, al analizar los pesos en altura, se pudo observar que los pesos del grupo tratado fueron menores que el grupo control (cuadro 4), llegando a un peso en la sexta semana de 1.831Kgr. en el grupo tratado vs. 1.961Kgr. en el grupo control, encontrándose diferencia estadística en las semanas 3, 4 y 5 en la que los pesos del grupo tratado son menores que el control; aquí también podemos evidenciar el efecto que ejerce el NIT provocando depresión en la ganancia de peso.

En el cuadro 5 se muestra los casos de aves que morían y que presentaban ascitis detectados por necropsia durante la crianza, en el cual, los valores semanales del grupo tratado fueron menores en todas las semanas, respecto al grupo control, llegando a un acumulado total de 25 aves con ascitis; mientras que el grupo control llegó a un acumulado de 48 aves con ascitis. Al realizar la prueba estadística de Diferencia De Proporciones, se encontró diferencia estadística entre los valores acumulados totales de ambos grupos. Al sumar todos los casos ascíticos totales (cuadro 5) en ambos grupos, tenemos 73 casos de ascitis, del cual 48 casos del grupo control representan el 65.75 % del total, mientras que los 25 casos de ascitis encontrados en el grupo tratado representan el 34.25 %, obteniendo la proporción de presentación de casos de ascitis de 2 a 1 respectivamente. Estos resultados demuestran que el NIT administrado en el agua de bebida en el grupo tratado, ejerció un papel protector al ave al evitar notablemente la presentación de casos de ascitis, pero por su efecto depresor en la ganancia de peso tal como se muestran en los cuadros de ganancia de peso y presentación de casos de ascitis.

Al observar el gráfico 1, podemos apreciar que las curvas de los valores plasmáticos de nitritos encontrados en los grupos tratados fueron mayores a sus controles, y a su vez se aprecia que la curva del grupo tratado a nivel del mar, es mayor que la gráfica del grupo tratado en altura, observándose que en la tercera semana los valores del grupo tratado a nivel del mar presenta su valor mas bajo, mientras que en altura se registró su valor más alto en la misma semana, evidenciando un consumo del nitrito administrado en la terapia; en cuanto a los valores de los grupos controles se observa unas graficas más uniformes.

VI. CONCLUSIONES

- Concluimos que el Nitrito (Nitrito de Sodio) administrado en el agua de bebida ejerció un efecto depresor en la ganancia de peso.
- La baja ganancia de peso en el grupo tratado en altura previno de manera notable la presentación de casos de ascitis.
- Los valores de nitrito plasmáticos del grupo tratado en altura fueron menores que la encontrada en la crianza a nivel del mar.
- La proporción de presentación de los casos de ascitis totales en el grupo control versus el grupo tratado en altura fue de 2 a 1 respectivamente.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar más estudios con nitrito y establecer su efecto específico en condiciones de hipoxia por altura.
- Establecer una dosis de NITRITO en pollos de carne que no cause depresión de la ganancia de peso y ver que efecto presentaría en altura.

VIII. LITERATURA CITADA.

1. Adams R. 1994. New frontiers in medicine: The discovery of endogenous nitric oxide. PROC. 12th ACVIM. 750-751.
2. ADAMS R. H. 1998. Prostaglandinas. In: Booth N. H. y L. E. Mc Donald. Eds. Farmacología y terapéutica veterinaria. 50 ed. Zaragoza (España) Editorial Acribia S.A.: 453-462.
3. Angulo H. P, F. D. Andamayo, G. G Ruiz. 2004c. Primera evidencia experimental la participación del óxido nítrico en la patología de altura utilizando dos modelos animales. Resúmenes del ECli 2004, 30 de julio/02 agosto.
4. Angulo H. P., B. J. Espinoza, A. V. Fernández, C. D. Diaz. 2004a Primer reporte sobre niveles elevados de nitritos en plasma de pollos de carne, ¿ un hallazgo trascendental?. MV Rev de Cien Vet, 20(2): 3-5.
5. Angulo H. P., B. J. Espinoza, A. V. Fernández, C. D. Diaz. 2004b. Los niveles elevados de nitritos en pollo de carne proceden del óxido nítrico. MV Rev de Cien Vet, 20(3): 3-7.
6. Arce M. A., V. E. Gutiérrez, G. E. Avila, C. C. López. 2002. Temperatura ambiental en la crianza del pollo de engorda sobre los parámetros productivos y la mortalidad por el síndrome ascítico. Tec. Pecu. Méx., 40(3): 285-289.
7. Arce J. 1991. Restricción alimenticia para disminuir la ascitis. Avic Prof; 8(3): 96-102.
8. Aree, M. J., C. C. López. 1987b. Estudio descriptivo de órganos de pollo de engorda afectados con el Síndrome Ascítico. Memorias XII Convención Nacional de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícola, p125-130.
9. Aree, M. J., C. C. López. 1987a. Análisis de la incidencia del síndrome Ascítico en el valle de México. Tec. Pecu. Méx., 25 (3): 338-346.
10. Ballinger S.W., C. Patterson, C.N. Yan, R. Doan, D.I. Burow, C.G. young, F.M. Yakes, B. Van Houten, C.A. Balliger, B.A. Freeman, M.S. Runge. 2000. Hydrogen peroxide and peroxyinitrite induced mitochondrial DNA

damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circ. Res*; 86: 960-966.

11. Berger, M. M. 1992. La restricción alimenticia en el síndrome ascítico en pollos de engorde. *Avic Prof.*, 9(3): 12-22.
12. Berkenbosch, J.W., J. Baribeau T. Perraul. 2000. Decreased sintesis and vasodilation to nitric ioxide in piglets with hipoxi induced pulmonary hipertensión. *Lung Mol Physiol*; 278(2): L276-L283.
13. Blackman, D.J., J.A. Morris, J.J. Atherton, G.R. Ellis, R.A. Anderson, J.R. Cockcroft, M.P. Grenneaux. 2000. Endotjelium-derived nitric oxide xontributes to the regulation of venous tone in humans. *Circulation*; 101(2):165-170.
14. Brovkovich, V., L.W. Dobrucki, S. Brovkovich, L. Dobrucki, C.A. Do Nascimento, A. Burewicz, T. Malinski. 1999. Nitric oxide release from normal and dysfunctional endothelium. *J Physiol Pharmacol*; 50(4):575-586.
15. Bustamante L. J.. 1997. Producción Avícola. 2da Edición, Facultad de Medicina Veterinaria UNMSM.
16. Carville C., S. Adnot, S. Ed danibi, E. Teiger, D. Rideau, B. Raffestin. 1997. Induction of nitric oxide synthase activity in pulmonary arteries from normoxic and chronically hypoxic rats. *Eur respir J*; 10: 437-445.
17. Cueva S. 1998. Hipoxia Investigaciones Básicas y Clínicas. Tercer Boletín Extraordinario IVITA.
18. Currie R.J.W. 1999. Ascitis in poultry. recent investigations. *Avian Pathol*, 28(4): 313-326.
19. Drumm K., R. Oettinger, R. Smolarski, M. Bay, K. Kienast. 1998. In vitro study of human alveolar macrophages inflammatory mediator transcriptions and releases induced by soot FR 101, Printex 90, titandioxide and chrysotile B. *Eur J Med Res.*, 3(9): 432-438.
20. Dumas J. P., M. Dumas, C. Sgro, C. Advenier, J. F. Diudicelli. 1994. Effects of two K⁺ channel openers, aprikalim and pinacidil, on hipoxic pulmonary vasoconstriction. *Eur. J. Pharmacol.*, 263: 17-23.
21. Dupeyron J. P., J. P. Monier, P. Fabiamni. 1970. "Nitrates alirmentaires et methemoglobinemie du nourrisson." *Ann. Biol. Clin.*, 28, pp.331-6.

22. Earley S., I. D. Nelin, I. G. Chicoine, B. R. Walker. 2002. Hypoxia-induced pulmonary endothelin-1 expression is unaltered by nitric oxide. *J. Appl. Physiol.*, 92: 1152-1158.
23. Ebert b. L., H. F. Bunn. 1999. Regulation of the erythropoietin gene. *Blood.*, 94 (6): 1864-1877.
24. Eddahibi S., B. Raffestin, M. Clozel, M. Levane, S. Adonot. 1995. Protection from pulmonary hypertension with an orally active endothelin receptor antagonist in hypoxic rats. *Am. J. Physiol.*, 268: H828-H835.
25. Fagan K. A., P. Huang, I. Mcmurty, D. Rodman. 1998. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) deficient mice have increased sensitivity to hypoxia. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 157: A588.
26. Fike C. D., M. R. Kaplowitz, C. J. Thomas, I. D. Nelin. 1998. Chronic hypoxia decreases nitric oxide production and endothelial nitric oxide synthase in newborn pig lungs. *Am. J. Physiol.*, 274: L517-L526.
27. Fong L., M. Carlos. 1978. Causas que producen mermas en el transporte de Aves de consumo para la ciudad de Lima. 24h. UNMSM – FMV.
28. Forstermann U, H.W. Schmidt, J.S. Pollock, H. Sheng, J.A. Mitchell, T.D. Warner. et al. 1991. Isoforms of nitric oxide synthase. *Biochem Pharmacol.* 42: 1649-1857.
29. García M.A., A.S. Peña. 1998. Oxido nítrico y enfermedad inflamatoria intestinal *Rev.Esp. Enferm. Dig;* 90 (12): 870-876.
30. Ge R. L., S. witkowski, C. Zhang, M. Alfrey, T. Sivieri, G. K. Karlsen, M. Resaland, J. Harber, B.D. Stray, D. levine. 2002. Determinants of erythropoietin release in response to short-term hypobaric hypoxia. *J. Appl. Physiol.*, 92: 2361-2367.
31. Gross S.S.,M.S.Wolin.1995.Nitric-oxide-Pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol* , 57:737-769.
32. Hall S.A., N. Machicao. 1967. Myocarditis in broiler chickens reared at high altitudes. *Avian Dis*, 12: 75-84.
33. Hampl V., J. Herget. 2000. Role of nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary hypertension. *Physiol. Rev.*, 80(4): 1337-1372.

34. Haroun H. E., D. Bradnury, A. Clayton, A. J. Knox. 2004. Interleukin-1 β , transforming growth factor- β 1 and bradykinin attenuate cyclic AMP production by human pulmonary artery smooth muscle cells in response to prostacyclin analogues and prostaglandin E2 by cyclooxygenase-2 induction and down regulation of adenylyl cyclase isoforms 1, 2 and 4. *Circ. Res.*, 94: 353.
35. Hernández V. A. 1986. La ascitis hipóxica en pollos: influencia y posibles soluciones. *Avicultura profesional*; 4(4): 152-153.
36. Hintze T. H., H. Tada, K. E. Loke, F. A. Recchia. 1999. Contribution of nitric oxide to the control of cardiac oxygen and substrate consumption during the development of heart failure. *J. Cardiac. Failure.*, 5(Supp2): 23.
37. Holden, W.E; E.M. Burnham, M.A. Lee, S.P. Bagby. 1992. Influence of growth oxygen level on eicosanoid release from lung endothelial cells during hypoxia. *Am J Physiol*; 263: L454-L459.
38. <http://www.lenntech.com/espanol/formulario-de-consulta.htm>.
39. Ichinose F., F. Ullrich, A. Sapirstein, R. C. Jones, L.J. V. Bonventre, C. N. Serhan, k. D. Bloch, w. M. Zapol. 2002. Cytosolic phospholipase A2 in hypoxic pulmonary vasonctriction. *J. Clin. Invest.*, 109(11): 1493-1500.
40. Ide, H., H. Nakano, T. Ogasa, S. Osanai, K. Kibuchi, J. Iwamoto. 1999. Regulation of pulmonary circulation by alveolar axygen tension via airway nitric oxide. *J. Appl. Physiol.*, 87(5): 1629-1636.
41. Julian R.J. 1993. Ascites in poultry. *Avian Pathol*, 22: 419-454.
42. Julian J. R. 1993. Ascites in poultry. *Avian Pathology*; 22: 3.
43. Korovkina V. P. 2002. Molecular diversity of vascular potassium channel isoforms. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 29:317-23.
44. Lowenstein D. 1994. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Annals of internal medicine*, 120: 227-37.
45. Maxwell M.H., G.W. Robertson, S. Spence.1986. Studies on ascitic syndrome in young broilers. 1. Haematology and pathology. *Avian Pathol*; 15: 525-538.

46. Meade E. A., D. A. Jones, G. A. Zimmerman, T. M. McIntyre, S. M-prescott. 1996. Prostaglandins and related compounds: lipid messengers with many actions. Handbook of Lipid Research, Chapter 9, Vol. 8.
47. Michel T., G.K. Li, L. Buscón. 1993. Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase. Proc Natl Acad Sci USA, 90: 6252-6256.
48. Moncada S., R.J. Palmer, E.A. Higos. 1989. Biosíntesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. Biochem Pharmacol, 38: 1709-1715.
49. Moncada S., R.J. Palmer, E.A. Higos. 1991. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev, 43: 109-142.
50. Moreno M., A. Hernández. 1996. La hipertensión pulmonar en pollos de engorde. Patogénesis, control y perspectivas de investigación. Rev de CEISA; 3(1): 65-79.
51. Murad F., K. Ishi, U. Förstermann, L. Gorsky, J.F. Kervin, J. 1990. et al. EDRF is an intracellular second messenger and autacoid to regulate cyclic GMP synthesis in many cells. Second Messenger Phosphoprotein Res.; 24: 441-445.
52. National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI). 1994. Role of nitric oxide in the pathogenesis of lung disease. Clinical Studie: 94-h-0141.
53. Navarro-Antolini J. 2005. Decreased expression of maxi-K⁺ channel beta1-subunit and altered vasoregulation in hypoxia. Circulation 112:1309-15.
54. Ndengele M. M., C. J. Bellone, A. J. Lechner, G. M. Matuschak. 2000. Brief hypoxia differentially regulates LPS-induced IL-1 and TNF-gene transcription in RAW 264.7 cells. Lung Cell and Mol Physiol., 278(6): L1289-L1296.
55. O'Brij S.O. y A.J. Peacock. 1998. Celular responses to hypoxia in the pulmonary circulation. Thorax; 53: 1075-1079.
56. Odom T.W y W.M. Chillian. 1993. Pulmonary vascular growth is attenuated relative to somatic growth in young broiler chickens. Poultry Sci; 72(1): 106.
57. Odum T.W. 1993. Ascites syndrome: over view and update: Poult Digest, 52: 14-22.

58. Ohata, T., Y. Sawa, K. Kadoba, K. Kagisaki, K. Suzuki, H Matzuda. 2000. Role of nitric oxide in a temperature dependent regulation of systemic vascular resistance in cardiopulmonary bypass. *Eur J. Cardiothorac Surg*; 18(3):342-347.
59. Palmer R.M.J., A.G. Ferrige. 1987. Nitric Oxide release accounts for the biological activity on endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327: 524-526.
60. Palmer R.M.J, S. Moncada. 1989. A novel citruline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Comm*, 158: 348-355.
61. Peacock, A.J., C. Pickett, K. Morris, J.T. Reeves. 1990. Spontaneous hypoxaemia and right ventricular hypertrophy in fast growing broiler chickens resired at sea level. *Com Biochem Physiol*; 97A: 537-541.
62. Peña J., A. S. Aluja, R. Navarro. 1992. Insuficiencia cardiaca congestiva derecha en becerras Holstein de reemplazo I-II. *Clínica y patología Vet. Max*; XXIII: 2.
63. Perez A., A. Rodriguez, V. M. Sanjuro, R. Padrón. 1997. El papel del óxido nítrico en la hemodinámica, hemostasia e inflamación. *Rev. Cubana Estomatol.*, 34(2): 84-86.
64. Ploog, H.P. 1999. Efecto de la altura en pollos broilers. *Ovonoticias*; 48:48-51.
65. Post J.M., C.H. Gelband, J.R. Hume. 1995. $[Ca^{2+}]_i$ inhibition of K^+ channels in canine pulmonary artery. Novel mechanism for hypoxia-induced membrane depolarization. *Circ. Res*; 77: 131-139.
66. Pozo, D. 1998. et al: Producción de óxido nítrico y su modulación en el sistema inmune y el sistema nervioso. *Arch Neurocienc (Mex)*.; 2: 84-94.
67. Raffestin B., S. Adnot, S. Eddahibi. 2002. Roles of vasoconstriction and gene expression in hypoxia-induced pulmonary vascular remodelling. *Fac. Med. Univ. de Creteil. Creteil*, 21p.
68. Raychaudhuri B., R. Dweik, M. J. Conoors, I. Buhrow, A. Malur, J. Drazba, A.C. Arroliga, S.C. Erzurum, M.S. kavuru, M.J. Thomassen. 1999. Nitric

- oxide blocks nuclear factor-kappa B activation in alveolar macrophages. *Am J Resp Cell Mol Biol*; 21(3): 311-316.
69. Rubin G. 1996. Endogenous and exogenous nitric oxide donors. *Comp. Cont. Educ*; 639-645.
70. Savourey, G., C. Moirant, J. Bittel. 1995. Acute mountain sickness release to sea level partial pressure of pxygen. *Eur J Appl Phisiol*; 70 (66): 469-476.
71. Scheele, C.W., E. De'Cuypere, P.F.G. Vereijken, F.J.G. Shreurs. 1992. Ascities in broilers. Disturbances in the hormonal regulation of metabolic rate and fat metabolism. *Poultry Sci*; 71: 1971-1984.
72. Schmidt H.H., U. Walter. 1994. NO at Work. *Cell*; 78 (6): 919-25.
73. Semenza G.L. 2000. HIF-1: Mediator of physiological and pathophysiological response to hypoxia. *Am J physiol*, 88(4): 1474-14780.
74. Serhan C.N., E. Oliw. 2001. Unorthodox routes to porstanoid formation: New twists in cyclooxygenase-initiated pathways. *J. Clin. Invest*; 107(12): 1481-1489.
75. Shimoda L., J. T. Sylvester, S. K. Sham. 1999. Chronic hypoxia alters effects of endothelin and angitensin on K⁺ currents in pulmonary arterial myocytes. *AJP: Lung Cell Mol Physiol.*, 277(3): L431-439.
76. Sidi, D., J.R.G. Kuipers, D. Teitel. 2006. Developmental changes in oxygenation and circulatory responses to hypoxaemia in lambs. *Am J Physiol*; 245: H674-H682.
77. Simon, C. 1966. "L'intoxication par les nitrites après ingestion d'épinards (une forme de méthémoglobinémie)." *Arch. Fr. Ped.* 23, pp. 231-8.
78. Sreejayan S, M.N. Rao. 1997. Nitric oxide scavenging bicorcuminooids. *J. Pharm. Pharmacol.*
79. Steudel W., F. Ichinose, P. L. Huang, W. E. Huford, R. C. Jones, J. A. Bevan, M. C. Fishman, W. M. Zapol. 1997. Pulmonary vasoconstriction and hypertension in mice with targeted disruption of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Circ. Res.*, 81: 34-41.
80. Taddei, S., A. Viridis, L. Ghiadoni, I. Sudano, A. Salvetti. 2000.. Antihypertensive drugs and reserving of endotelial dysfunction in hipertensión. *Curr Hypertens Rep*; 2(1): 64-70.

81. Václav H. and J. Herget. 2000. Role of Nitric Oxide in the pathogenesis of Chronic Pulmonary Hypertension. *Physiological Reviews* Vol 80, n°4.
82. Ward J.P., P.I. Aaronson. 1999. Mechanism of hypoxic pulmonary vasoconstriction: can anyone be right?. *Respir. Physiol*; 115:261-271.
83. Waypa G.B., N.S. Chandel, P.T. Schumacker. 2001. Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing. *Circ. Res*; 88: 1259-1266.
84. World Health Organisation (WHO). 1962. "Evaluation of the toxicity of a number of antimicrobials and antioxidants, P. 6
85. Wrigt C.L., D.D. Rees, S. Moncada. 1992. Protective and pathophysiological roles of nitric oxide in endotoxin shock. *Cardiovasc Rev.* 26-48.
86. Yan S. F., I. Tritto, D. Pinsky, H. Liao, J. Huang, G. Fuller, J. Brett, L. May, D. Stern. 1995. Interleukin 6 (IL6) by hypoxia in vascular cells. Central role of the binding site for nuclear factor IL6. *J Biol Chem.*, 270:11463-11471.
87. Yan, S., J. Lu, L. Xu, Y.S. Zou, J. Tongers, W. Kisiel, N. Mackman, D.J. Pinsky, D.M. Stern. 2000. Pulmonary expression of early growth response 1: biphasic time course and effect of oxygen concentration. *J. Appl Physiol*; 7:A175- A180.
88. Yu A.Y., M.G. Frid, L.A. Shimoda, C.M. Wiener, K. Stenmark, G.L. Semenza. 1998. Temporal, sapatial and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung. *Am J Physiol*; 275: L818-L82.
89. Zhang M, B. Luo, H. Chen, G.A. Abrams, M. Fallon. 1999. Endothelin-1 stimulation of endothelial nitric oxide synthase in the pathogenesis of hepatopulmonary syndrome. *Amer J Physiol*;277:G944-G952.
90. Zhi zhang, D. Naughton, P. G.Winyard. 1999 Generation of Nitric Oxide by a Nitrite Reductase Activity of Xantine Oxidase: A Potential Pathway for Nitric Oxide Formation in the Absence of Nitric Oxide Synthase Activity. July 13, 1999.