

Primera Evidencia Experimental de la Participación del Óxido Nítrico en la Patología de Altura utilizando dos Modelos Animales

Pedro Angulo H*; Juan A Espinoza B; Diego Díaz C y Víctor Fernández A.

RESUMEN

La exposición de los organismos a la altura resulta en cambios fisiológicos significantes y puede producir el mal de altura (MA). A pesar de numerosas investigaciones en el último siglo, la fisiopatología del MA todavía no está definida. El objetivo de esta investigación fue determinar los niveles de óxido nítrico (NO) en el plasma de pollos de carne y ratas criados en Huancayo a 3320 msnm comparados con animales de la misma edad criados a nivel del mar. El NO fue determinado indirectamente como nitrito utilizando la reacción de Griess. Nuestros resultados ponen en evidencia la participación del NO en MA en dos modelos animales.

Palabras clave: mal de altura, Óxido nítrico y mal de altura, óxido nítrico en aves.

SUMMARY

Exposure of the human body to high altitude results in significant physiologic changes and may precipitate mountain sickness (MS). Despite extensive investigations over the last century, the pathophysiology of high altitude sickness remains elusive. The aim of this research was to examine nitric oxide levels (NO) in plasma from Cobb chickens and rats reared at 3320 meters above sea level in Huancayo compared with animals reared at sea level. The Griess reaction was used to determine NO levels based on nitrite stable metabolite concentrations. Our results make evident the participation of NO in MS in two animal models.

Key words: mountain sickness, high altitude sickness, nitric oxide and mountain sickness, nitric oxide in poultry

INTRODUCCIÓN

El "mal de altura" (MA) o "mal de la montaña" es una patología provocada por la menor presión de oxígeno (hipoxia) que existe en las zonas elevadas del Perú y que aparece en los viajeros como consecuencia del ascenso relativamente rápido a altitudes mayores de 2,500 msnm⁽¹⁾. Los animales cuando son expuestos a baja presión de oxígeno, también, tienden a generar hipertensión arterial pulmonar⁽²⁾, haciéndose más evidente en pollos de carne⁽³⁾, en los cuales además de la hipertensión arterial pulmo-



nar^(3,4) hay, en algunos casos, dilatación, hipertrofia e insuficiencia cardíaca derecha⁽⁵⁾. Estudios realizados en conejos⁽⁶⁾ y en ratas^(7,8) indican que una baja tensión de oxígeno genera una remodelación en los constituyentes estructurales y celulares de la arteria pulmonar que inhibe su relación por incremento de su matriz extracelular con proliferación y migración de células musculares lisas.

A pesar de las numerosas investigaciones realizadas, aún no se conoce la causa exacta del MA. Sin embargo, se han identificado diversos metabolitos o factores que intervienen como moduladores o mediadores en la remodelación vascular lo cual genera hipertensión arterial pulmonar; como la endotelina-1 (ET-1)⁽⁹⁾, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)⁽¹⁰⁾, angiotensina II (ANG II)⁽¹¹⁾ y el óxido nítrico (NO)^(8,12). El NO es un segundo mensajero intracelular generado por una familia de enzimas conocidas como sintasas del NO (NOSs)^(13,14,15). Dos de ellas (endotelial eNOS y neuronal nNOS) son expresadas constitutivamente; la otra isoforma (descubierta inicialmente en los macrófagos) generalmente se induce (iNOS) en el organismo durante la inflamación por la presencia de ciertas citocinas inflamatorias y/o productos bacterianos^(16,17). Las tres isoformas de NOS (eNOS, nNOS, iNOS) están presentes en el pulmón y se han reportado su incremento en modelos de hipertensión pulmonar inducidos por hipoxia⁽¹⁸⁾.

El óxido nítrico tiene una vida media muy corta, de aproximadamente 6 segundos; pero lo suficiente para re-

* Laboratorio de Farmacología, Toxicología y Terapéutica Veterinaria, Facultad Medicina Veterinaria -UNMSM.*

accionar con el agua y producir a nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-). Por lo que, existe una alta correlación entre la producción endógena de óxido nítrico y los niveles en plasma, suero y orina de NO_2^- y $\text{NO}_3^- = (\text{NO}_x)$ (19, 20).

En nuestro país, son numerosas las investigaciones realizadas en MA; sin embargo, aún no se ha considerado la participación del NO en esta patología. Entonces nos propusimos demostrar que los niveles plasmáticos del NO en ratas y pollos de carne de diferentes edades varían significativamente cuando son sometidos a la hipoxia (aguda y crónica) medioambiental de Huancayo en comparación con los animales que son criados a nivel del mar. Nuestros resultados ponen en evidencia la participación del NO en la patología de altura.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en los laboratorios de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina Veterinaria-UNMSM en Lima (nivel de mar), y del Centro de Investigación IVITA-El Mantaro a una altura de 3320 mnsm.

Reactivos:

Todas las sustancias químicas fueron de grado analítico y obtenidas de Sigma Chemical Co.

Animales:

Ratas machos Hotzman y pollos de carne Cobb Vantres

Metodología:

- Determinación de los niveles de óxido nítrico en ratas y pollos sometidos a hipoxia aguda medioambiental. Se utilizaron 180 pollos de 20 días de edad (PA) y 180 ratas adultas (RA) (3 meses de edad), nacidos y criados a nivel del mar. La mitad de estos animales fueron transportados a la altura y se les determinó los niveles de NO en grupos de 15 cada uno; al primer, segundo, quinto, séptimo, décimo cuarto y vigésimo primer día de permanecer en la altura. Lo mismo se realizó con los animales que quedaron a nivel del mar.
- Determinación de los niveles de óxido nítrico en ratas y pollos sometidos a hipoxia crónica medioambiental. De 120 pollos BBs de un día de nacidos (PB) y 120 ratas juveniles (RJ) (recién destetadas), la mitad fueron transportados y criados en la altura. A todos los animales en grupos de 10 cada uno se les determinó el NO, a la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta y sexta semana.

Cuantificación del óxido nítrico:

El NO fue determinado indirectamente como nitrito mediante la reacción de Griess (21, 22, 23). Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 3,500 rpm durante 10 minutos para obtener el plasma (se utilizó heparina como anticoagulante). El plasma fue desproteínizado utilizando sulfato de zinc en medio alcalino (24). Las lecturas se hicieron en un digital Spectrophotometer LaboMed a 546 nm y referidas a la absorbancia de soluciones de nitrito de sodio tratadas de la misma manera con el reactivo de Griess.

Método estadístico:

Para la evaluación estadística los datos se sometieron a la prueba de "T student" usando un intervalo de confianza de 95%

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Es muy conocido que los mamíferos (2, 6, 7, 8, 25, 26) y las aves (3, 4, 5, 27) presentan MA muy similar al humano; razón por lo cual hemos utilizado a la rata y el pollo de carne como modelos animales para evidenciar la participación del NO en la patología de altura.

En comparación con los pollos criados a nivel del mar, se puede apreciar que la hipoxia medioambiental tiende a disminuir, aun más, los niveles plasmáticos de NO en los PA cuando permanecieron durante 21 días en la altura (Fig. 1). Esto coincide con los resultados de Espinoza y col. (28) quienes encontraron la misma tendencia en pollos de 18 días de edad cuando fueron introducidos y mantenidos en la misma altura durante 19 días. Previamente, Angulo y col. (29) han reportado que en los pollos de carne Cobb criados a nivel del mar, en condiciones no controladas, los niveles de NO se elevan progresivamente hasta aproximadamente los 10-12 días de edad, para luego disminuir hasta niveles estables a los 30 días, aproximadamente.

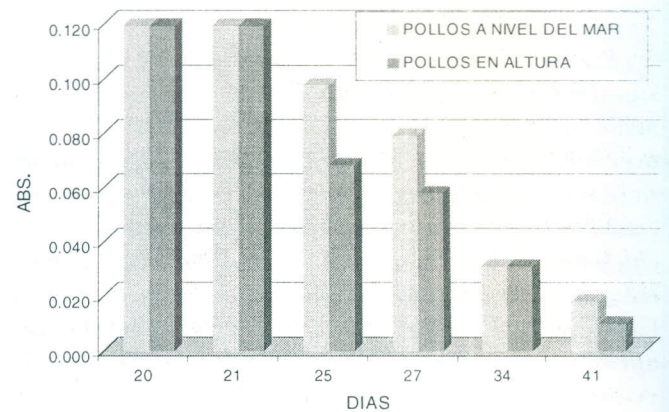


Figura 1: Niveles de NO en PA introducidos a la altura

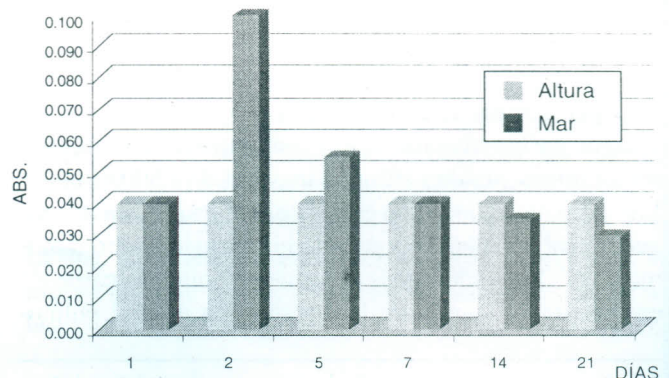


Figura 2: Niveles de NO en RA introducidas a la altura

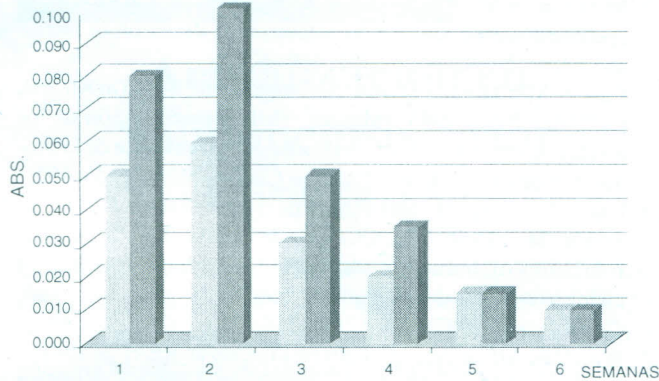


Figura 3: Niveles de NO en PB introducidos a la altura

En cambio en RA, en la cual los niveles de NO son estables, la hipoxia aguda medioambiental eleva los niveles de NO al día siguiente de permanecer en la altura (Fig. 2), lo cual está de acuerdo con los estudios de los mecanismos de resistencia a la hipoxia de Malyshev *et al.* (30) quienes han demostrado que la hipoxia aguda induce la sobreproducción de NO. Estos niveles se normalizan al séptimo día y tienden a disminuir, a los 14 y 21 días. McQuillan *et al.*, (31), han reportaron que la producción del NO a partir de las células endoteliales puede verse significativamente suprimido por la hipoxia, hecho verificado por Adnot *et al.* (32) en ratas, quienes observaron que el efecto de la relajación vascular asociada con el NO en pulmones era inhibido a las tres semanas de exposición a una hipoxia crónica. La explicación que dió Crawley *et al.*, (33) a una similar exposición crónica de ratas, es que la hipoxia genera un deterioro selectivo de la enzima guanil ciclasa soluble de las arterias pulmonares.

El efecto de la hipoxia crónica prolongada fue evaluada en las mismas especies pero con menos edad.

Cuando los PB fueron sometidos y mantenidos en la hipoxia medioambiental de Huancayo, los niveles de NO se elevan significativamente hasta la cuarta semana de permanecer en la altura de Huancayo (Fig. 3). Lo mismo se observa en las RJ (Fig. 4). Según Pohl y Busse (34) la hipoxia estimula, *in vitro*, la liberación del factor relajante del endotelio (NO), y Manukhina *et al.* (35) determinaron en ratas que los niveles de NO_2^- , NO_3^- y NO se incrementaron como adaptación a la hipoxia prolongada, ellos concluyeron que la adaptación a la hipoxia estimula la producción de NO y esos efectos potencialmente puede destacar los efectos benéficos de la adaptación dependientes del NO. Hampl *et al.* (36) encontraron, también, que la hipoxia potencia la sintasa del NO en células endoteliales de la arteria pulmonar y Le Cras *et al.*, (37) en un análisis de los pulmones de ratas expuestas a hipoxia crónica indicaron que la expresión de la eNOS y la iNOS se incrementó en los pulmones de ratas sometidas a hipoxia crónica y se expresó de *novo* la proteína eNOS en el endotelio de la microvasculatura.

De acuerdo con Malyshev y Manukhina (38) el estrés

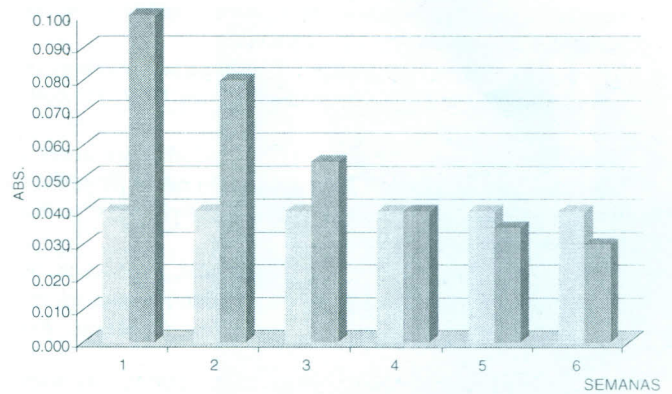


Figura 4: Niveles de NO en RJ introducidas a la altura

provocado por diversos factores medioambientales es un activador de la síntesis de NO y en diferentes tipos de adaptación a los factores medioambientales, la producción de NO se incrementa. Esto puede haber ocurrido en los animales experimentados por nosotros, sobre todo en los juveniles donde la elevación es más duradera. En otra investigación, hemos encontrado que en pollos de 8 días de edad, cuya concentración de NO normalmente va subiendo a nivel del mar, sus valores disminuyeron dramáticamente durante los tres primeros días, después empiezan a subir a valores mayores que los controles; mientras que, en pollos de en pollos adultos de 39 días de edad las modificaciones no son significativas (28). Esto tendría relación con el hecho de que el MA afecta de diferente manera a las personas de diferente edad, los niños son los más susceptibles; lo mismo sucede en animales donde el MA se presenta con mayor frecuencia en animales jóvenes (39). Nuestros resultados indican que los animales juveniles son más susceptibles que los adultos al impacto de la hipoxia medioambiental sobre la producción de NO.

Por primera vez, en nuestro país, se pone en evidencia la participación del NO en la patología de altura en dos modelos animales; pero también surge la hipótesis en relación al rol del NO en la adaptación de los organismos al estrés hipóxico. Entonces, se hace necesario investigaciones adicionales para elucidar estos mecanismos en función de la edad del animal y determinar cuál es su origen enzimático lo que facilitaría contar con nuevos conocimientos y con un nuevo blanco terapéutico para la investigación y desarrollo de drogas útiles en la prevención y tratamiento del mal de altura.

BIBLIOGRAFÍA

1. Honigman, B; Theis, MK; Koziol-McLain, J; Roach, R; Yip, R; Houston, C; Moore, LG. Acute mountain sickness in general tourist population at moderate altitudes. *Ann Int Med* 1993; 118: 587-592.
2. Ayón, M; Cueva, S. Adaptación del ganado bovino a la altura. *Pub Téc FMV* 1998; 38: 15p.
3. Burton, RR; Beach, EL; Smith, AH. Effect of chronic hypoxia on the pulmonary arterial blood pressure of the chicken. *Am J Physiol* 1968; 214: 1438-1442.
4. Cueva, S; Sillau, H; Valenzuela, A; Ploog, H. High altitude in-

- duce pulmonary hypertension and right heart failure in broiler chicken. *Res Vet Sci* 1974; 10: 370-374.
5. Olander, HJ; Burton, RR; Adler, HE. The pathophysiology of chronic hypoxia in chickens. *Avian Diseases* 1967; 11: 609-620.
 6. Johns, RA; Linden, JM; Peach, MJ. Endothelium-depend relaxation and cyclic GMP accumulation in rabbit pulmonary artery are selectively impaired by moderate hypoxia. *Circ Res* 1989; 65: 1508-1515.
 7. Widimsky, J; Urbanova, D; Ressler, J; Ostadal, B; Pelouch, V; Prochazka, J. Effect of intermittent altitude hypoxia on the myocardium and lesser circulation in the rat. *Cardiovasc Res* 1973; 7: 798-808.
 8. Zhao, L; Crawley, DE; Hughes, JMB; Evans, TW; Winter, RJD. Endothelium-derived relaxing factor activity in rat lung during hypoxic pulmonary vascular remodeling. *J Appl Physiol* 1993; 74: 1061-1065.
 9. Li, H; Chen, SJ; Chen, YF; Meng, QC; Durand, J; Oparil, S; y Elton, TS. Enhanced endothelin-1 and endothelin receptor gene expression in chronic hypoxia. *J Appl Physiol* 1994; 77: 1451-1459.
 10. Tuder, RM; Flook, BE; Voelkel, NF. Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide. *J Clin Invest* 1995; 95: 1798-1807.
 11. Morrel, NW; Morris, KG; Stenmark, KR. Role of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II in development of hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol* 1995; 269: H1186-H1194.
 12. Xue, C; Rengasamy, A; Le Cras, TD; Koberna, PA; Dailey, GC; Johns, RA. Distribution of NOS in normoxic vs. Hypoxic rat lung: upregulation of NOS by chronic hypoxia. *Am J Physiol* 1994; 267: L667-L678.
 13. Nathan, C; Xie Q-W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 1994; 269: 13725-13728.
 14. Knowles, RG; Moncada, S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298: 249-258.
 15. Stuehr, DJ; Griffith, OW. Mammalian nitric oxide synthases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1994; 65: 287-346.
 16. Forstermann, U; Closs, EI; Pollock, JS; Nakane, M; Schwarz, P; Gath, I; Kleinert, H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 1994; 23: 1121-1131.
 17. Michel, T; Xie, OW; Nathan, C. Molecular biological analysis of nitric oxide synthases. In: Feelisch M, Stamler J (eds) *Methods in Nitric Oxide Research*. John Wiley and Sons. NY 1996; 161-175.
 18. Shaul, PW; North, AJ; Brannon, TS; Ujje, K; Wells, LB; Nisen, PA; Lowenstein, CJ; Snyder, SH; Star, RA. Prolonged *in vivo* hypoxia enhances nitric oxide synthase type I and type III gene expression in adult rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 13: 167-174.
 19. Granger, DL; Taintor, RR; Boockvar, KS; Hibbs, JB Jr. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. *Methods Enzymol* 1996; 268: 142-151.
 20. Ignarro, LJ; Fukuto, JM; Griscavage, JM; Rogers, NE; Byrns, RE. Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: Comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8103-8107.
 21. Green, LC; Wagner, DA; Glogowski, J; Skipper, PL; Wishnok, JS et al. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Ann Biochem* 1982; 126: 131-138.
 22. Miranda, KM; Espey, MG; Wink, DA. A rapid simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 2001; 5(1): 62-71.
 23. Cascos, MP; Morales Martín, AI; Angulo, HP; Silva Do Amaral, C; Núñez Bravo, MD; Miguez, SMP. Determinación de los niveles de nitratos/nitritos en plasma como indicador de la producción de óxido nítrico. *Química Clínica* 2001; 20 (5): 402.
 24. Unno, N; Wang, H; Menconi, MJ; Tytgat, SHAJ; Larkin, V; Smith, M; Morin, MJ; Chavez, A; Hodin, RA; Fink, MP. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates endotoxin-induced gut mucosal barrier dysfunction in rats. *Gastroenterol* 1997; 113: 1246-1257.
 25. Will, DH; Alexander, AF; Reeves, JT; Grover, RF. High altitude induced pulmonary hypertension in normal cattle. *Circulation Res* 1962; 10:172-177.
 26. Grover, RF; Reeves, JT; Blount, SG Jr. Pulmonary vasoconstriction in steers at high altitude. *J Appl Physiol* 1963; 18: 567-574.
 27. Pizarro, B; Salas, A; Paredes, J. Mal de altura en aves. *IV Boletín Extraordinario del IVITA, UNMSM* 1970; 4: 147-151.
 28. Espinoza, BJE; Angulo, HP; Fernández, AVE; Díaz, CD; Cueva, MSE; Ayón, SM; Vásquez, CME. Estudio comparativo de los niveles de óxido nítrico en plasma de pollos de carne sometidos a la altura y a nivel del mar. 2004. *En prensa*.
 29. Angulo, HP; Espinoza, BJA; Cueva, MSA; Fernández, AVE; Díaz, CD; Vásquez, C. Primer reporte sobre niveles elevados de nitritos en plasma de pollos de carne, un hallazgo trascendental? 2004. *En prensa*.
 30. Malyshev, IY; Zenina, TA; Golubeva, LY; Saltykova, VA; Manukhina, EB; Mikoyan, VD; Kubrina, LN; Vanin, AF. NO-dependent mechanisms of adaptation to hypoxia. *Nitric Oxide* 1999; 3(2): 105-113.
 31. McQuillan, LP; Leung, GS; Marsden, PA; Kostyk, SK; Kourembanas, S. Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanism. *Am J Physiol* 1994; 267: H1921-H1927.
 32. Adnot, S; Raffestin, B; Eddahibi, S; Braquet, P; Chabrier, P. Loss of endothelium-dependent relaxant activity in the pulmonary circulation of rats exposed to chronic hypoxia. *J Clin Invest* 1991; 87: 155-162.
 33. Crawley, DE; Zhao, L; Giembycz, MA; Liu, S; Barnes, PJ; Winter, RJD; Evans, TW. Chronic hypoxia impairs soluble guanyl cyclase-mediated pulmonary arterial relaxation in the rat. *Am J Physiol* 1992; 263: L325-L332.
 34. Pohl, U; Busse, R. Hypoxia stimulates the release of endothelium-derived relaxant factor (EDRF). *Am J Physiol* 1989; 256: H1595-H1600.
 35. Manukhina, EB; Malyshev, IY; Smirin, BV; Mashina, SY; Saltykova, VA; Vanin, AF. Production and storage of nitric oxide in adaptation to hypoxia. *Nitric Oxide* 1999; 3(5): 393-401.
 36. Hampl, V; Cornfield, DN; Cowan, NJ; Archer, SL. Hypoxia potentiates nitric oxide synthesis and transiently increases cytosolic calcium levels in pulmonary artery endothelial cells. *Eur Respir J* 1995; 8: 515-522.
 37. Le Cras, TD; Xue, C; Rengasamy, A; Johns, RA. Chronic hypoxia upregulates endothelial and inducible NO synthase gene and protein expression in rat lung. *Am J Physiol* 1996; 270: L164-L170.
 38. Malyshev, I; Manukhina, EB. Stress, adaptation and nitric oxide (review). *Biochemistry* 1998; 63: 992-1006.
 39. Rabinovitch, M; Gamble, WJ; Meittinen, OS; Reid, L. Age and sex influence on pulmonary hypertension of chronic hypoxia and on recovery. *Am J Physiol* 1981; 240: H62-H72. (MV)