



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL**

**EFFECTO DE LA ALIMENTACIÓN PROGRAMADA SOBRE EL SÍNDROME
ASCÍTICO, PARÁMETROS PRODUCTIVOS, HORMONAS TIROIDEAS E
INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN POLLOS CRIADOS A ELEVADA
ALTURA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

FRANCISCO TREJO SÁNCHEZ

TUTOR:

CARLOS LÓPEZ COELLO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

COMITÉ TUTOR:

SILVIA CARRILLO DOMÍNGUEZ

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

ERNESTO ÁVILA GONZÁLEZ

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CIUDAD DE MÉXICO, SEPTIEMBRE 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

Dios es el día y la noche, el invierno y el verano, la guerra y la paz, la saciedad y el hambre... a Dios.

A Lilith, por ser la fuerza motriz que mueve mi universo.

A mi compañera de viaje, Selene Vergara González por amarme y ayudarme siempre a realizar mis sueños.

A Margarita y Ricardo, que jamás me han olvidado.

A Ricardo Trejo.

A Virginia y Manuel, por la vida.

A Miguel Berger, *Il Miglior Fabbro* (Purgatorio XXVI, 117).

De las serpientes son los signos misteriosos.

Porque de las serpientes crecen números.

Ramón Martínez Ocaranza.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme realizar los estudios de maestría.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por brindarme una digna formación académica.

Al Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la FMVZ, por abrirme sus puertas y darme la oportunidad de realizar este trabajo.

A la empresa Avigrupo México, por todo el crecimiento laboral, intelectual y personal que me ha brindado y por el apoyo financiero para la realización de mis estudios de maestría.

A DSM, por el apoyo financiero para la realización de las pruebas de hormonas tiroideas.

Al MC. Cuauhtémoc Nava Cuellar, por compartirme sus valiosos conocimientos y experiencia en bioquímica para la ejecución de este trabajo.

Al Dr. Carlos López Coello, por ser mi tutor y apoyarme durante mis estudios de maestría.

Al Dr. Ernesto Ávila González, por compartirme sus opiniones para el mejoramiento de mi trabajo.

A la Dra. Silvia Carrillo Domínguez, por su valiosa participación en este trabajo.

A mi jurado

A Armando Bolaños y todo el personal de la granja “La Consentida”, que me permitieron trabajar con ellos durante la realización de este trabajo.

A los pollitos que se utilizaron en este proyecto.

RESUMEN.

El síndrome ascítico (SA), es un desorden metabólico que afecta a los pollos de engorda criados a elevada altitud. La alimentación programada (AP), antes llamada restricción alimenticia, consiste en reducir el consumo de alimento y es un método eficaz para prevenir el SA. Las hormonas tiroideas (HT) son importantes reguladores de la temperatura corporal, el crecimiento, el metabolismo del oxígeno y la energía producida en las aves. Las HT se ven afectadas por la AP. El estrés oxidativo (EO) es un desequilibrio entre los radicales libres y los antioxidantes, el EO puede desarrollarse en condiciones de hipoxia hipobárica como la observada a elevada altitud sobre el nivel del mar y también durante el desarrollo de SA. Se llevó a cabo un experimento con 1600 pollos machos (Ross 308) de 7 días de edad repartidos aleatoriamente en 4 tratamientos con 5 repeticiones de 80 aves cada una; 100% del consumo recomendado por la línea genética (AP100), 90% de consumo (AP90), 80% de consumo (AP80) y 70% de consumo (AP70), durante 35 días a partir de los 7 días de edad. La AP redujo significativamente la mortalidad total y la mortalidad por SA. La reducción del consumo de alimento, resultó en una disminución del peso corporal. La conversión alimenticia comercial y la conversión alimenticia ajustada por el peso de la mortalidad, también disminuyeron con la AP. Al mismo tiempo, las HT fueron afectadas por la AP al observarse un aumento de éstas conforme se reducía el consumo de alimento. Los indicadores de EO resultaron alterados por la AP al disminuir la lipoperoxidación celular en tejido pulmonar y cardíaco, preservar la capacidad antioxidante total, incrementar la actividad de la enzima glutatión peroxidasa y aumentar los niveles de ácido ascórbico en dichos tejidos. Los tratamientos de AP al 80% y 70% mejoraron la mortalidad por SA, los kg de carne producidos (al menos en tratamiento AP80), la conversión alimenticia comercial, la conversión alimenticia corregida por el peso de la mortalidad, la función de las HT y mejoró las condiciones de EO en aves criadas a elevada altitud (2250 msnm).

Palabras Clave: Síndrome ascítico, parámetros productivos, hormonas tiroideas, hipoxia hipobárica, estrés oxidativo, alimentación programada.

ABSTRACT.

Ascites syndrome (SA) is a metabolic disorder that affects broilers raised at high altitude. Programmed feeding (AP), previously called feed restriction, consists in reducing feed consumption and is an effective method to prevent SA. Thyroid hormones (HT) are important regulators of body temperature, growth, oxygen metabolism and energy metabolism in birds. HT are affected by the AP. Oxidative stress (EO) is an imbalance between free radicals and antioxidants. EO can develop in conditions of hypobaric hypoxia such as that found at high altitude and also during the development of SA. An experiment was conducted with 1600 7 days old male broilers (Ross 308) randomly distributed in 4 treatments with 5 replicates of 80 birds each; 100% consumption of the recommendations for the genetic line (AP100), 90% consumption (AP90), 80% consumption (AP80) and 70% consumption (AP70). The experiment lasted 35 days starting at 7 days of age. AP reduced total mortality and ascites mortality. Reduced feed consumption decreased body weight. Commercial feed conversion and dietary feed conversion adjusted by the weight of mortality were also reduced by AP. At the same time, HT were affected by AP. An increase in HT was observed as feed consumption was reduced. The indicators of EO were affected by AP decreasing cellular lipoperoxidation in pulmonary and cardiac tissue, preserving total antioxidant capacity, increasing glutathione peroxidase activity and increasing ascorbic acid levels in those tissues. The 80% and 70% AP treatments were effective in improving total mortality, mortality due to SA, kg of meat produced, commercial feed conversion, feed conversion adjusted by the weight of mortality, HT function and EO conditions in birds raised at high altitude (2250 meters above sea level).

Keywords: Ascites syndrome, productive parameters, thyroid hormones, hypobaric hypoxia, oxidative stress, programmed feeding.

CONTENIDO

	Pág
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
ÍNDICE DE CUADROS	IX
ÍNDICE FIGURAS	X
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Síndrome ascítico (SA) en pollos de engorda.....	3
2.1.1 Definición.....	3
2.1.2 Etiología.....	3
2.1.2.1 Genética y SA.....	3
2.1.2.2 Tasa de crecimiento y SA.....	6
2.1.2.3 Capacidad vascular y pulmonar limitada.....	7
2.1.2.4 Hipoxia como desencadenante del SA.....	8
2.1.3 Prevención del SA.....	10
2.1.3.1 Alimentación programada (AP).....	10
2.1.4 Signología del SA.....	13
2.2 Hormonas tiroideas.....	14
2.2.1 Síntesis, liberación y concentración.....	14
2.2.2 Activación y degradación.....	16
2.2.3 Eje hipotálamo-hipofisario-tiroideo.....	17
2.2.4 Efectos de las hormonas tiroideas.....	18
2.2.4.1 Efectos de las hormonas tiroideas en el desarrollo.....	18
2.2.4.2 Efectos sobre el metabolismo y la termorregulación.....	20
2.2.5 Influencias ambientales sobre la función tiroidea.....	22
2.2.6 Hormonas tiroideas y SA.....	23

2.3 Estrés oxidativo y daño oxidativo.....	25
2.3.1 Definición.....	25
2.3.2 Radicales libres (RL).....	25
2.3.3 Especies reactivas de oxígeno (ROS).....	28
2.3.3.1 Superóxido ión radical ($O_2^{\cdot-}/HO_2^{\cdot}$).....	28
2.3.3.2 Radical hidroxilo (OH^{\cdot}).....	29
2.3.3.3 Peróxido de hidrógeno (H_2O_2).....	30
2.3.4 Sistema antioxidante.....	30
2.3.4.1 Vitamina C.....	30
2.3.4.2 Vitamina E.....	31
2.3.4.3 Glutación (GSH).....	32
2.3.4.4 Superóxido dismutasa (SOD).....	33
2.3.4.5 Tiorredoxina (Trx).....	34
2.3.4.6 Catalasa (CAT).....	35
2.3.4.7 Glutación peroxidasa (GSH-Px).....	35
2.3.5 Estrés oxidativo y elevada altitud.....	37
2.3.6 Mecanismo de defensa celular contra la hipoxia.....	39
2.3.7 Estrés oxidativo y SA.....	41
3. JUSTIFICACIÓN.....	43
4. HIPÓTESIS.....	43
5. OBJETIVOS GENERALES.....	43
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
7.1 Ubicaciones.....	44
7.2 Animales, instalaciones y protocolo de alimentación programada.....	44
7.3 Dietas.....	45
7.4 Parámetros productivos.....	45

7.5 Diagnóstico de SA.....	45
7.6 Hematocrito y hormonas tiroideas (T3 y T4).....	46
7.7 Saturación de hemoglobina con oxígeno (saturación HbO ₂).....	46
7.8 Indicadores de estrés oxidativo.....	46
7.8.1 Lipoperoxidación.....	47
7.8.2 Actividad de la glutatión peroxidasa.....	47
7.8.3 Capacidad antioxidante total (FRAP).....	49
7.8.4 Determinación de ácido ascórbico.....	50
7.8.5 Determinación de proteína.....	51
7.9 Análisis estadísticos.....	51
8. RESULTADOS	52
8.1 Incidencia de SA y mortalidad.....	52
8.2 Parámetros productivos.....	53
8.3 Relación ventrículo derecho: ambos ventrículos y medidas cardiacas.....	56
8.4 Hematocrito, hormonas tiroideas y saturación HbO ₂	56
8.5 Indicadores de estrés oxidativo.....	58
8.5.1 Capacidad antioxidante total (FRAP) en tejido pulmonar y cardiaco.....	58
8.5.2 Lipoperoxidación en el tejido pulmonar y cardiaco.....	59
8.5.3 Actividad de GSH-Px en tejido pulmonar y cardiaco.....	61
8.5.4 Concentración de ácido ascórbico en el tejido pulmonar y cardiaco.....	62
9. DISCUSIÓN	63
9.1 Parámetros productivos.....	63
9.2 Medidas cardiacas.....	65
9.3 Hematocrito y saturación HbO ₂	66
9.4 Hormonas tiroideas.....	67
9.5 Estrés oxidativo.....	69
10. LITERATURA CONSULTADA	74

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág
Cuadro 1. Altitud, presión barométrica, PO ₂ ambiental y PIO ₂	10
Cuadro 2. Distribución de la mortalidad total, mortalidad por SA e incidencia de SA en los diferentes niveles de alimentación programada.....	52
Cuadro 3. Efecto de la AP sobre el PC (g) a diferentes edades.....	54
Cuadro 4. Efecto de la AP sobre el PDCA (g/d) a diferentes intervalos de edad.....	54
Cuadro 5. Efecto de la AP sobre la CAM (kg/kg) a diferentes edades.....	54
Cuadro 6. Efecto de la AP sobre la CAC (kg/kg) a diferentes edades.....	55
Cuadro 7. Efecto de la AP sobre la relación VD:AV y medidas cardiacas.....	56
Cuadro 8. Efecto de la AP sobre el HC y la concentración plasmática de hormonas T3 y T4.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Factores fisiológicos y patofisiológicos en el síndrome ascítico.....	4
Figura 2. Las hormonas tiroideas y sus vías de desyodación.....	14
Figura 3. Síntesis de hormonas tiroideas.....	15
Figura 4. Efectos fisiopatológicos de la crianza del pollo a elevada altitud.....	37
Figura 5. Efecto de la alimentación programada sobre la mortalidad por SA a diferentes edades (entre 14 y 42 días).....	52
Figura 6. Efecto de la alimentación programada sobre la mortalidad total a diferentes edades (entre 14 y 42 días).....	53
Figura 7. Efecto de la alimentación programada sobre el factor de eficiencia europeo (FEE).....	55
Figura 8. Efecto de la alimentación programada sobre los kg producidos.....	55
Figura 9. Efecto de la alimentación programada sobre la saturación de hemoglobina con oxígeno (HbO ₂).....	58
Figura 10. Efecto de la alimentación programada sobre la capacidad antioxidante total (FRAP) en el tejido pulmonar.....	58
Figura 11. Efecto de la alimentación programada sobre la capacidad antioxidante total (FRAP) en el tejido cardiaco.....	59
Figura 12. Efecto de la alimentación programada sobre la lipoperoxidación en el tejido pulmonar.....	60
Figura 13. Efecto de la alimentación programada sobre la lipoperoxidación en el tejido cardiaco.....	60
Figura 14. Efecto de la alimentación programada sobre la actividad de glutatión peroxidasa (GSH-Px) en el tejido pulmonar.....	61
Figura 15. Efecto de la alimentación programada sobre la actividad de glutatión peroxidasa (GSH-Px) en el tejido cardiaco.....	61
Figura 16. Efecto de la alimentación programada sobre la concentración de ácido ascórbico en el tejido pulmonar.....	62
Figura 17. Efecto de la alimentación programada sobre la concentración de ácido ascórbico en el tejido cardiaco.....	62

1. INTRODUCCIÓN.

El pollo de engorda moderno ha sido seleccionado genéticamente para alcanzar mayores tasas de crecimiento y de forma indirecta, para una elevada tasa de síntesis de proteínas que requiere más oxígeno para mejorar la conversión alimenticia (CA) y generar un mayor rendimiento de carne (Baghbanzadeh y Decuypere, 2008). Las líneas modernas de pollo de engorda son capaces de alcanzar el peso del mercado en un 60% menos de tiempo que los pollos de engorda de hace 40 años (Zuidhof *et al.*, 2014). Éste rápido crecimiento tiene un alto riesgo de predisposición a síndrome ascítico (SA). El SA es un importante desorden metabólico (Hassanzadeh *et al.*, 2014) mediado por la genética, la nutrición y el medio ambiente (Decuypere *et al.*, 2000; Balog, 2003; Julián, 2005). A gran altitud, se genera hipoxia hipobárica que se define como la disminución de la disponibilidad de oxígeno debido a una reducción de la presión parcial de éste. La hipoxia desencadena la constricción parcial de la vasculatura pulmonar, además, disminuye la apoptosis y aumenta la proliferación de las células de la pared de los vasos sanguíneos provocando remodelación vascular (Siques *et al.* 2018). También induce una disminución de oxígeno en el contenido de la sangre arterial denominada hipoxemia en pollos de engorda de rápido crecimiento (Julian, 2007). La hipoxemia conduce al aumento del hematocrito (HC) y un incremento del gasto cardíaco. Estas respuestas se combinan para aumentar la carga de trabajo de la musculatura del ventrículo derecho, lo que resulta en una hipertrofia compensatoria de éste ventrículo. El deterioro posterior del músculo ventricular derecho y la falla de la válvula aurículo-ventricular derecha conduce a insuficiencia cardíaca congestiva que culmina como ascitis en pollos de engorda susceptibles (Özkan *et al.*, 2010). Hassanzadeh *et al.* (2004) reportan que la mortalidad por SA en aves criadas a 2100 msnm en comparación con las que son criadas a nivel del mar ascendió a 87% del total de la mortalidad. Para reducir la mortalidad por SA en aves criadas a gran altitud, existen diversas prácticas. Una de ellas es la alimentación programada (AP), antes llamada restricción alimenticia, que consiste en reducir el consumo de alimento de manera sistemática. Khajali *et al.* (2007) informaron una reducción de la mortalidad por SA con una AP de disminución de consumo cada tercer día durante la segunda semana de vida en pollos criados a 2100 msnm. Sin embargo, los parámetros productivos como peso corporal (PC) y producción de kilogramos de carne pueden

verse afectados negativamente por los protocolos de AP, lo cual podría depender de la duración y severidad de los mismos (Acar *et al.*, 1995; Özkan *et al.*, 2006; Zhan *et al.*, 2007). Las hormonas tiroideas (HT), T3 y T4, son hormonas clave en el metabolismo energético, el crecimiento y la generación de temperatura en las aves, siendo T3 la forma biológicamente activa (Zhan *et al.*, 2007). Se ha reportado que la AP disminuye la concentración de la T3 y aumenta los valores de T4 en pollos de engorda (Darras *et al.*, 1995). Finalmente, se ha demostrado que la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) está relacionada con el desarrollo de SA (Khajali y Wideman, 2016). Arab *et al.* (2006) reportaron que existe una mayor producción de radicales hidroxilo (OH \cdot) en pollos de engorda predispuestos a SA, luego de ser inducidos a éste mediante la administración de hormona T3 y exposición al frío. Enkvetchakul *et al.* (1993) demostraron que los niveles de ácido ascórbico eran bajos en los pulmones y en el hígado de pollos de engorda con SA alojados en un entorno con pobre ventilación durante 7 semanas. La hipoxia progresiva inducida por la exposición a gran altitud interrumpe la eficiencia del sistema antioxidante y, debido al aumento en el nivel de producción de ROS, puede provocar daños oxidativos en las macromoléculas (Dosek *et al.*, 2007). Así mismo, Pan *et al.* (2005) comprobaron que la aplicación de la AP puede disminuir el daño oxidativo. Por lo tanto, el presente estudio tiene como objetivo determinar el efecto de la AP sobre el SA, los parámetros productivos, la concentración de hormonas tiroideas y el estado oxidativo de pollos de engorda criados a elevada altitud.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 SÍNDROME ASCÍTICO (SA) EN POLLOS DE ENGORDA.

2.1.1 Definición.

El SA es una entidad con características epidemiológicas, clínicas y anatomopatológicas constantes que transcurren entre otros signos y lesiones con ascitis, por lo tanto, la ascitis puede ser parte de un síndrome generalizado (Figura 1) como el SA (López-Coello *et al.*, 1991).

La ascitis se define como la acumulación de exudado seroso en la cavidad abdominal (Lopez-Coello *et al.*, 1991; Wideman *et al.*, 2013), debido al aumento de la permeabilidad vascular, disminución de la presión oncótica del plasma, drenaje linfático obstruido, aumento de la presión hidráulica en el sistema venoso esplácnico o una combinación de éstos (Kalmar *et al.*, 2013).

2.1.2 Etiología.

Se ha desarrollado una gran cantidad de investigación sobre el SA. No obstante, la causa principal no está del todo clara (Crespo y Shivaprasad, 2003). La fisiopatología de este síndrome (Figura 1) ha sido ampliamente estudiada (Julian, 1993, 2000; Sheele, 1996; Hassanzadeh *et al.*, 1997; Decuypere *et al.*, 2000; Wideman, 2000a). Decuypere *et al.* (2000) clasifica como endógenas y exógenas las causas que ocasionan el SA. A continuación, se describen las más importantes para fines de este trabajo.

2.1.2.1 Genética y SA.

Las aves de corral con tasas de crecimiento más rápidas tienen más probabilidades de desarrollar SA. Genéticamente, el pollo de engorda moderno, especialmente los machos parecen ser más propensos a SA. Se ha reportado una mayor mortalidad por SA en líneas parentales de machos (Dewil *et al.*, 1996). Esto se debe probablemente a la extrema selección ya sea para incrementar la tasa de crecimiento o bien para mejorar el índice de conversión de alimentos lo que exige mucho a los procesos metabólicos y a la demanda de oxígeno (Decuypere *et al.*, 2000).

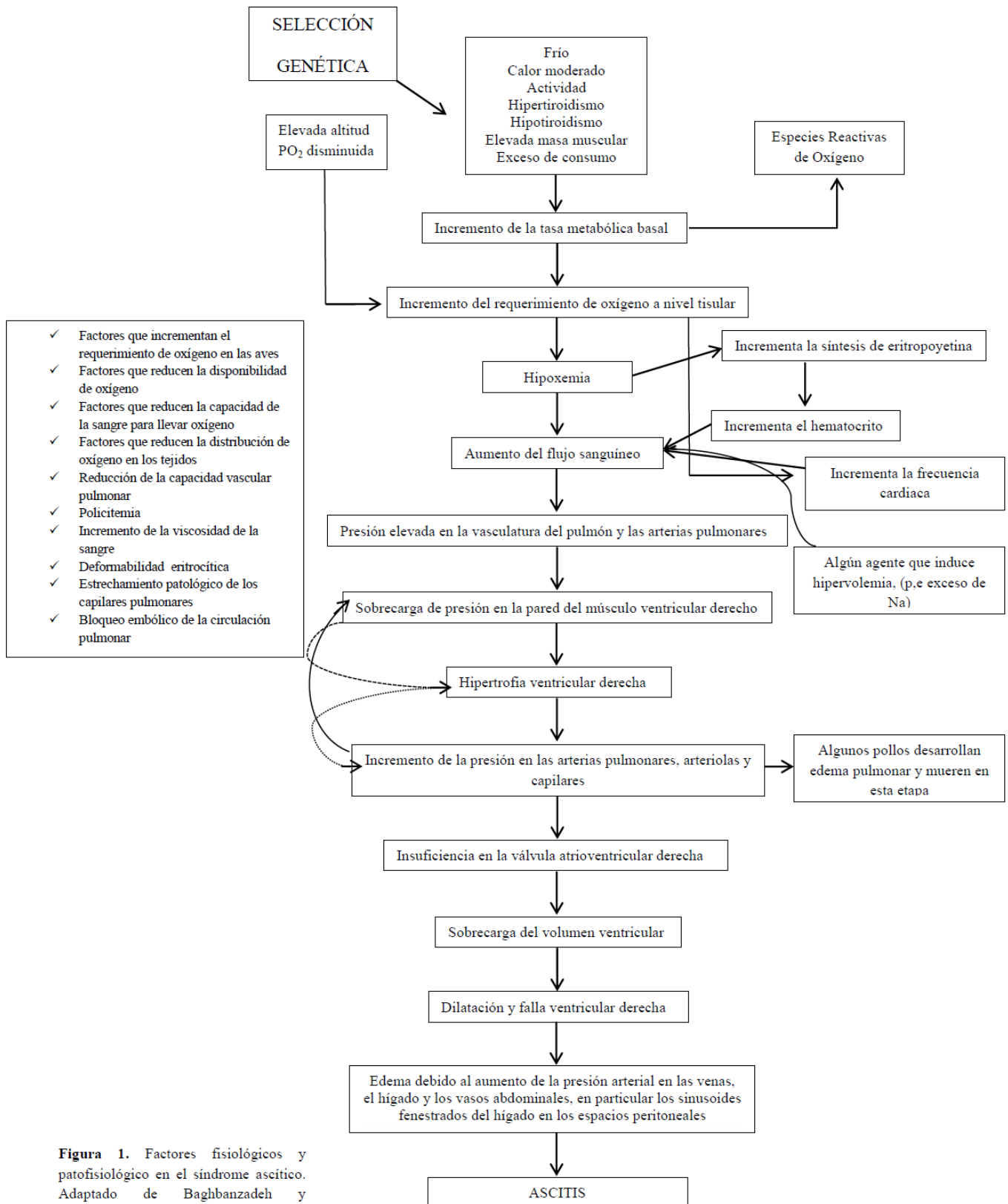


Figura 1. Factores fisiológicos y patofisiológico en el síndrome ascítico. Adaptado de Baghbanzadeh y Decuyper. [2008], Kalmar et al. [2013]

Closter *et al.* (2012) demostraron que se observa una mayor heredabilidad y una correlación genética más alta en machos que en hembras para SA. Por lo tanto, en circunstancias como el SA, los datos en pollos de engorda deben analizarse por separado.

El progreso en la selección de la resistencia y susceptibilidad al SA se debe a heredabilidades que van de moderadas a altas y a rasgos relacionados con el SA, como la relación ventrículo derecho : ambos ventrículos. Moghadam *et al.* (2001) evaluaron machos de 2 razas, White Rock y Cornish, seleccionados durante 11 generaciones por rasgos que incluyen el peso corporal, y determinaron que los valores de heredabilidad del SA oscilaron entre 0.22 y 0.40. Druyan *et al.* (2007) pudieron crear una línea de pollos de engorda susceptibles al SA a través de la selección de hermanos de aves que sucumbían al SA después de la exposición al frío. Se determinó que el SA dentro de esta población experimental era alta, con un valor de 0.57. Lubritz *et al.* (1995) demostraron una heredabilidad favorable para la acumulación de líquido en la cavidad abdominal y la relación del peso del ventrículo derecho con el peso de ambos ventrículos.

Se ha demostrado que la mayor incidencia de SA ocurre en pollos de engorda que combinan baja CA con una rápida tasa de crecimiento, mientras que en los pollos de engorda de lento crecimiento o CA más alta la incidencia de SA fue mucho más baja. Una baja CA en aves de rápido crecimiento fue atribuida a bajos valores de producción de calor. Además, las aves seleccionadas para un crecimiento rápido y CA baja tenían una presión de oxígeno (PO₂) disminuida y una presión de CO₂ (PCO₂) alta en sangre venosa a baja temperatura ambiente en comparación con las aves de lento crecimiento (Decuypere *et al.*, 2005).

Actualmente se están haciendo esfuerzos dirigidos a producir material genético adaptable a una amplia gama de ambientes y para disminuir la incidencia de trastornos metabólicos y fisiológicos, como el SA (Pakdel *et al.*, 2004). Las aves con altos niveles de saturación de oxígeno (SaO₂) en la sangre tienen una susceptibilidad reducida a SA y síndrome de muerte súbita. La industria de aves para cría incorporó la evaluación de rutina de SaO₂ en su estrategia de selección. Esto se hace eliminando individuos y familias que se encuentran debajo de los niveles promedio de SaO₂. Con el tiempo, dicha práctica ha llevado a un aumento significativo de los niveles de SaO₂ de la sangre,

por lo tanto, reduciendo la susceptibilidad del SA (Druyan *et al.*, 2007; Wideman *et al.*, 2013). Por otra parte, también se han desarrollado protocolos para predecir y consecuentemente eliminar la incidencia de SA en las parvadas de pollos modernos. Tarrant *et al.* (2018) evaluaron el sistema SNP (Red Neuronal Artificial) para tal efecto. En dicho estudio concluyeron que el uso de paneles de SNP será útil para retener la precisión genética perdida a través de la selección de hermanos, contribuyendo así a una disminución en la frecuencia de SA.

2.1.2.2 Tasa de crecimiento y SA.

Existe una correlación directa entre la tasa metabólica y la incidencia de SA. Una tasa de crecimiento rápida aumenta la demanda de oxígeno y, por lo tanto, la carga de trabajo del corazón. Los pollos modernos han sido intensamente seleccionados para mayores tasas de crecimiento e indirectamente para una alta síntesis de proteína que requiere más oxígeno (Baghbanzadeh y Decuypere, 2008), incrementar la eficiencia alimenticia (Decuypere *et al.*, 2000; Pakdel *et al.*, 2002) o el rendimiento de carne y porcentaje de pechuga (Hoving-Bolink *et al.*, 2000). Un pollo de engorda pesa 40 g en la eclosión y es capaz de crecer hasta 4000 g en 8 semanas. El aumento de la masa corporal casi 100 veces en 8 semanas no se puede mantener sin incrementos igualmente dramáticos en las capacidades funcionales del corazón y los pulmones (Wideman *et al.*, 2013). Las líneas modernas de pollo de engorda son capaces de alcanzar el peso del mercado en un 60% menos de tiempo que los pollos de engorda de hace 40 años (Zuidhof *et al.*, 2014). Sin embargo, la capacidad pulmonar y cardíaca de los pollos de engorda actuales es muy similar a las viejas líneas de pollos, lo que obliga a su sistema cardiopulmonar a trabajar muy cerca del límite fisiológico (Lorenzoni y Ruiz-Feria., 2006). La capacidad pulmonar no siempre cumple con las demandas de oxígeno necesario para un rápido crecimiento. Esto da como resultado un deterioro de la capacidad de regular el balance energético bajo condiciones extremas, como temperatura ambiente baja o elevada altitud snm (Luger *et al.*, 2003). Si el pulmón del pollo crece más lento que el resto del cuerpo, podría resultar en hipoxemia y SA (Julian, 2000).

2.1.2.3 Capacidad limitada de la vasculatura pulmonar.

El ventrículo izquierdo del corazón bombea la sangre oxigenada necesaria para soportar el metabolismo basal, la actividad y el crecimiento. El volumen de sangre bombeada por el ventrículo izquierdo cada minuto, conocido como gasto cardíaco, promedia 200 ml por kilogramo de peso corporal por minuto (Wideman, 1999). Una extrapolación lineal de este valor relativo indica que el gasto cardíaco absoluto debe aumentar 100 veces durante las 8 semanas posteriores a la eclosión, que van desde 8 ml / min para un pollito de 40 g hasta aproximadamente 800 ml / min para un pollo de engorda de 4 kg. La velocidad a la que la sangre venosa regresa al corazón debe ser igual al gasto cardíaco; por lo tanto, durante los primeros 2 meses posteriores a la eclosión, los vasos sanguíneos en los pulmones de un pollo de engorda deben desarrollar la capacidad para recibir y oxigenar un aumento de 100 veces en el retorno venoso. Se ha definido la capacidad de la vasculatura pulmonar para abarcar ampliamente las características anatómicas y funcionales, incluido el número total y el volumen de vasos sanguíneos en los pulmones, el tono (grado de constricción parcial) mantenido por las arteriolas precapilares que ofrecen la resistencia primaria al flujo sanguíneo pulmonar (Wideman y Bottje, 1993; Wideman, 2000b, 2001; Wideman *et al.*, 2007). Las evaluaciones de la hemodinámica cardiopulmonar indican que los pulmones del pollo de engorda poseen una capacidad muy limitada para emplear mecanismos compensatorios clave que permiten a los pulmones de los mamíferos acomodar fácilmente los aumentos en el gasto cardíaco, como la dilatación dependiente del flujo de las arteriolas precapilares, la distensión vascular o el reclutamiento de canales vasculares. En cambio, en los pulmones de los pollos de engorda de rápido crecimiento, todos los vasos sanguíneos disponibles parecen estar repletos de sangre, lo que indica que la vasculatura pulmonar posee una capacidad de reserva modesta incluso en condiciones ideales. La capacidad de la vasculatura pulmonar limitada de los pollos de engorda no es sorprendente en vista de la escasa correlación entre su volumen pulmonar absoluto y el peso corporal, y sus bajos volúmenes pulmonares en relación con el peso corporal en comparación con las aves domésticas Single Comb White Leghorn y las aves de la selva (Wideman *et al.*, 2013).

2.1.2.4 Hipoxia como desencadenante de SA.

El SA fue reportado por primera vez en parvadas de pollos de engorda criados a gran altitud en Bolivia (Hall y Machicao, 1968). La hipoxia hipobárica se define como la disponibilidad reducida de oxígeno atmosférico (presión parcial de oxígeno reducida) que ocurre a medida que aumenta la altitud (Julian, 2007). Debido a que la concentración relativa de oxígeno en la troposfera (capa atmosférica más baja) es constante en 20.93%, la presión parcial de oxígeno en el medio ambiente (PO_2) para una elevación dada se obtiene multiplicando 0.2093 por la presión barométrica correspondiente. A nivel del mar, PO_2 es 0.2093 multiplicado por 760 mm Hg, o 158.98 mm Hg, a 2000 metros de altura la PO_2 es de 126.52 mm Hg (Cuadro 1) (Gallagher y Hackett, 2004). El inicio de la hipoxia es detectado de inmediato por sensores dentro de las arteriolas pulmonares, que se contraen rápidamente en un intento de redirigir el flujo sanguíneo a regiones pulmonares mejor oxigenadas. A grandes altitudes, todo el pulmón experimenta hipoxia y toda la vasculatura pulmonar precapilar sufre una constricción parcial (se reduce el radio luminal de las arteriolas pulmonares). Además, los pollos de engorda hipóxicos exhiben una mayor incidencia de remodelación vascular. En condiciones fisiológicas, el grosor de la pared vascular se mantiene mediante un fino equilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis. Si este equilibrio se ve interrumpido a favor de una disminución de la apoptosis y una mayor proliferación, la pared vascular se engrosa y eventualmente puede obstruir la luz del vaso. Este proceso estructural, que conduce a una resistencia aumentada, se conoce como remodelación vascular. Este efecto de remodelación puede iniciarse rápidamente (Wideman *et al.*, 2011; Siques *et al.*, 2018), como resultado, aumenta la resistencia de la vasculatura pulmonar que obliga al ventrículo derecho del corazón a hipertrofiarse y desarrollar una presión arterial pulmonar elevada (hipertensión pulmonar) para impulsar el gasto cardíaco a través de las arteriolas pulmonares constreñidas (Owen *et al.*, 1995; Ruiz-Feria y Wideman, 2001).

La hipoxia hipobárica a una altitud simulada de 1000 msnm da como resultado hipoxemia en pollos de engorda. La hipoxemia se refiere a una reducción en el contenido de oxígeno de la sangre arterial, lo que refleja una saturación reducida de la hemoglobina con oxígeno. El crecimiento rápido puede contribuir a la hipoxemia en pollos de engorda porque el metabolismo intensivo

incurre en un alto requerimiento de oxígeno (Julian, 2007). La alta demanda de oxígeno por los tejidos que crecen rápidamente conduce a un aumento proporcional en el gasto cardíaco, que a su vez aumenta la velocidad con la que la sangre fluye a través de los pulmones de los pollos (Wideman, 1999).

A medida que aumenta la velocidad del flujo sanguíneo pulmonar, los glóbulos rojos eventualmente no residen en las superficies de intercambio de gases intrapulmonares el tiempo suficiente para adquirir una carga completa de oxígeno. Por lo tanto, la saturación incompleta de la hemoglobina con oxígeno contribuye al desarrollo de hipoxemia arterial sistémica (Wideman *et al.*, 2007) la hipoxemia le indica al riñón del ave que produzca eritropoyetina, que estimula la producción de glóbulos rojos y, por lo tanto, aumenta la capacidad de transporte de oxígeno por unidad de volumen de sangre completa. La policitemia posterior (hematocrito (HC) elevado) aumenta la viscosidad de la sangre, lo que a su vez requiere mayores aumentos en la presión arterial pulmonar para impulsar la sangre cada vez más viscosa a través de los pulmones. La combinación de la policitemia y la vasoconstricción pulmonar sostenida atribuible a la hipoxia contribuye a la aparición de hipertensión pulmonar que conduce a SA cuando los pollos de engorda se crían a elevadas altitudes (Julian, 2007; Wideman *et al.*, 2007; Wideman *et al.*, 2013).

Beker *et al.* (2003) evaluaron los efectos de la concentración gradual de O₂ atmosférico (12, 14, 16, 18 y 20.6%) en el rendimiento del crecimiento y el desarrollo de SA en pollos de engorda. Sus resultados indicaron que las reducciones en la disponibilidad de O₂ atmosférico indujeron efectivamente el SA. Además, los pollos de engorda expuestos al 12%, 14%, 16%, 18% y 20.6% de concentración de O₂ ganó 138, 287, 353, 356 y 371 g a los 14 días de edad, respectivamente, con valores de hematocrito respectivos de 49, 42, 36, 33 y 32. Muchas regiones productoras de pollos de engorda en todo el mundo tienen una altitud de 2000 msnm o mayor, que corresponde a la presión parcial de oxígeno de aproximadamente 126.5 mm Hg. La producción de pollos de engorda a una altitud tan elevada impone una hipoxia hipobárica significativa y se asocia con el desarrollo de SA.

Cuadro 1. Altitud snm, presión barométrica, PO₂ ambiental y PIO₂

Altitud		Presión barométrica (mm Hg)	PO ₂ ambiental (mm Hg)	PIO ₂ (mm Hg)
(msnm)	(Pies snm)			
0	0	759.6	158.98	149.1
1000	3281	678.7	142.05	132.2
2000	6562	604.5	126.52	116.7
3000	9843	536.9	112.37	102.5
4000	13123	475.4	99.50	89.7
5000	16404	419.7	87.84	78.0
6000	19685	369.4	77.31	67.5
7000	22966	324.2	67.85	58.0
8000	26247	283.7	59.37	49.5
8850	29035	252.7	52.89	43.1

La presión parcial de oxígeno (PO₂) en aire ambiental y en aire inspirado (PIO₂) cae casi exponencialmente en función del aumento de la altitud y la caída de la presión barométrica. Adaptado de Gallagher y Hackett, (2004).

2.1.3 Prevención del SA.

Existen diversos métodos para prevenir el SA: Uso de antioxidantes en la dieta (Hassanzadeh *et al.*, 1997; Geng *et al.*, 2004; Bautista-Ortega y Ruiz-Feria, 2010; Yousefi *et al.*, 2013; Khajali y Khajali, 2014), utilización de ácidos grasos omega-3 en la dieta (Walton *et al.*, 1999), programa de iluminación (Classen *et al.*, 1991; Buyse *et al.*, 1994, 1996; Buys *et al.*, 1998; Hassanzadeh *et al.*, 2000; 2003; 2005a; 2012) y finalmente, la alimentación programada, la cual se describirá a continuación.

2.1.3.1 Alimentación Programada (AP).

La manipulación de la tasa de crecimiento parece una forma práctica de prevenir el SA en parvadas de pollos de engorda criados en elevadas altitudes. En este contexto, se han estudiado varios protocolos de AP.

La AP se puede clasificar como cualitativa y cuantitativa. La AP cualitativa se define como la ingesta de nutrientes limitante (específica) a través de la dilución de la dieta (Sahraei, 2012); en este método, las dietas se mezclan con ingredientes no digeribles como la fibra y, por lo tanto, reducen la densidad de los nutrientes. Por otra parte, la AP cuantitativa se define como la disminución de la ingesta de nutrientes a través de la reducción de la cantidad de alimento físico

consumido (Van der Klein *et al.*, 2017). La AP física proporciona una cantidad calculada de alimento por ave, que a menudo es sólo lo suficiente para cumplir con los requisitos de mantenimiento (Plavnik y Hurwitz, 1985). Pero la aplicación práctica de la AP física, no es simple debido a los problemas de pesaje regular de las aves y al cálculo diario del consumo de alimento. Además, es necesario proporcionar suficiente espacio de comedero para evitar la competencia entre aves restringidas y para evitar el crecimiento desigual de las aves dentro de una parvada. También en este método se debe prestar atención sobre el consumo de micronutrientes, coccidiostatos, pigmentos, etc. (Camacho-Fernández *et al.*, 2002; Sahraei, 2012).

No obstante, diversos investigadores han logrado disminuir la incidencia del SA con estos métodos. Acar *et al.* (1995) probaron dos regímenes de AP, que consisten en limitar la ingesta diaria de alimento de las aves al 75% de la EM requerida para el crecimiento normal de 4 a 11 días, o de 7 a 14 días. La AP temprana redujo la incidencia de SA, pero a costa del crecimiento del músculo de la pechuga, de modo que las aves con alimentación completa tuvieron un rendimiento de pechuga significativamente mayor que las aves con AP. Saleh *et al.* (2005) reportan que la mortalidad en pollos con una AP de 7 a 14 días se redujo en un 3.47% respecto a los pollos que fueron alimentados *ad libitum*. Khajali y Qujeq (2005) informaron que una AP de omisión de consumo diario provocó un aumento de la actividad de lactato deshidrogenasa plasmática y se asoció con una menor incidencia de SA. Khajali *et al.* (2007) encontraron una reducción de la mortalidad por SA con un protocolo de AP de disminución de consumo de alimento cada tercer día durante la segunda semana de vida en pollos criados a 2100 msnm. Wijtten *et al.* (2010) descubrieron que el peso relativo del corazón del tratamiento con AP, fue menor en el día 6, 9 y 14 de edad que los pesos del corazón del tratamiento alimentado *ad libitum*. Özkan *et al.* (2010) aplicaron una AP de 7 a 14 días de edad a pollos de engorda machos y hembras criados en dos altitudes diferentes (nivel del mar y gran altitud a 1720 msnm). Llegaron a la conclusión de que el efecto de la AP para prevenir el SA solo se observó en pollos de engorda machos, lo que sugiere que la AP ayuda a algunos machos a aclimatarse mejor a la altura y evitar el SA. Mohammadalipour *et al.* (2017) probaron una AP al 40% del día 7 al día 14 de edad *vs* aves alimentadas a libre acceso. La mitad de las aves fueron inducidas a SA disminuyendo radicalmente la temperatura mientras

que la otra mitad permaneció en condiciones de termoneutralidad. Los investigadores reportaron que en condiciones de frío la AP redujo significativamente la mortalidad por SA argumentando que la restricción del crecimiento mediante la aplicación de la AP permite lograr una armonía entre el crecimiento somático y el crecimiento funcional de los órganos internos.

La hipótesis del modo de acción por el cual la AP reduce la incidencia de SA es sencilla. El alto consumo de alimento da como resultado un aumento en el requerimiento de oxígeno de las aves (Julian, 2000). El consumo de alimento de las aves por unidad de peso corporal metabólico se maximiza alrededor de las 2 o 3 semanas de edad e implica una marginal diferencia entre la capacidad de suministrar oxígeno y los requerimientos reales de oxígeno para metabolizar los alimentos (Albers *et al.*, 1990; Malan *et al.*, 2001). Se cree que la AP temprana ralentiza el metabolismo del ave y reduce sus requerimientos de oxígeno. Con la AP temprana se impide que el ave experimente tremendos aumentos de peso asociados con la rápida deposición de músculo y grasa. Adicionalmente, ha sido postulado que una restricción temporal del crecimiento permite un mayor desarrollo del sistema cardiopulmonar del ave, que no se ve afectado por la disminución de la tasa de crecimiento (Wideman, 1988; Arce-Menocal *et al.*, 1992; Susbilla *et al.*, 1994; Acar *et al.*, 1995; Buyse *et al.*, 1996; Buys *et al.*, 1998; González *et al.*, 1998). La AP también podría aumentar la ventilación parabronquial debido a la mejora de la aerodinámica valvular y la reducción tanto de la vasoconstricción pulmonar como de la insuficiencia ventricular derecha (Fedde *et al.*, 1998). Si esta AP es económicamente exitosa es porque las aves experimentan un consumo compensatorio después de retirar la AP. Si bien la AP es relativamente fácil de ejecutar para el criador y muy eficaz para reducir el SA su viabilidad económica es muy variable. La viabilidad económica se basa en el programa particular de la AP y su efecto en los datos de ganancia compensatoria y rendimiento, el precio actual del alimento y la incidencia de SA experimentada localmente (Shane, 1987; Albers *et al.*, 1990; Shlosberg *et al.*, 1991; Arce *et al.*, 1992; Tottori *et al.*, 1997; Decuyper *et al.*, 2000). Además, Dozier *et al.* (2002) refieren que a través de la AP se obtienen resultados inconsistentes y esa variación puede atribuirse parcialmente a las diferencias en el manejo de las aves, el programa de iluminación, la densidad de población y la ventilación.

2.1.4 Signología del SA.

Los signos y lesiones son; edema en cavidad abdominal, acumulación de líquido en el pericardio (derrame hidropericárdico) (Olkowski *et al.*, 2003), fibrosis epicárdica, edema pulmonar, corazón flácido y agrandado, hipertrofia y dilatación del ventrículo derecho (Decuypere *et al.*, 2000), cambios hepáticos variables, hipoxemia, cresta pálida, hematocrito sanguíneo elevado (Luger *et al.*, 2003), estos signos y lesiones indican que una gran cantidad de órganos (incluidos el corazón, pulmón, hígado, etc.) están involucrados en la enfermedad (Singh *et al.*, 2011).

2.2 HORMONAS TIROIDEAS.

2.2.1 Síntesis, liberación y concentración.

En las aves, tanto la tiroxina (T4) como la triyodotironina (T3) se consideran hormonas tiroideas (Figura.2). En general, las investigaciones sobre la función tiroidea aviar indican que los mecanismos de síntesis y liberación de hormonas por las tiroides de las aves (Figura. 3) son esencialmente equivalentes a los de los mamíferos (McNabb, 1992). El yoduro (I^-) se transporta activamente a las células foliculares tiroideas a través del transportador de yodo de sodio en la membrana basolateral de la célula. El yoduro luego se oxida en vesículas en la membrana celular apical en un proceso catalizado por la peroxidasa tiroidea. Luego se difunde en el coloide y se une covalentemente a algunos de los residuos de tirosilo de la tiroglobulina. Esto forma MIT y DIT. La peroxidasa tiroidea luego cataliza el "acoplamiento" de estos residuos para formar T4 a partir de dos residuos DIT y T3 a partir de un residuo MIT y uno DIT. La peroxidasa tiroidea luego cataliza el "acoplamiento" de estos residuos para formar T4 a partir de dos residuos DIT y T3 a partir de un residuo MIT y uno DIT.

Cuando se estimula la tiroides para producir T3 y T4, las gotitas coloides que contienen tiroglobulina se reabsorben mediante pinocitosis en las células foliculares. Estas gotitas luego se fusionan con los lisosomas y la tiroglobulina se hidroliza para formar T4 y T3. Estas hormonas se liberan en el líquido extracelular y luego en la circulación (Summers y McNab, 2017).

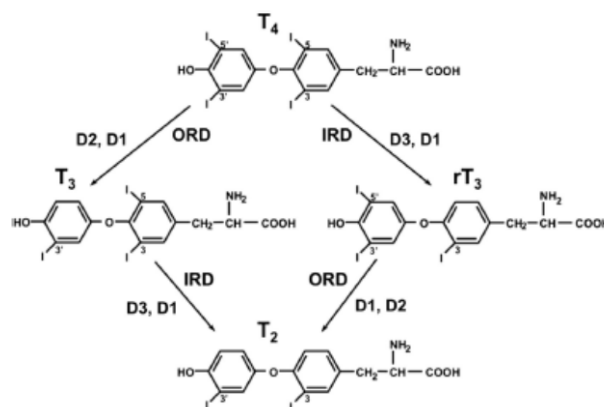


Figura. 2. Las hormonas tiroideas y sus vías de desyodación conducen a la activación e inactivación de la hormona tiroidea. T4, 3,5,3', 5'-tetraiodotironina o tiroxina; T3, 3,5,3'-triyodotironina; D1, deiodinasa tipo 1; D2, deiodinasa tipo 2; D3, deiodinasa tipo 3; IRD, desyodación del anillo interno; ORD, desyodación del anillo externo; rT3, 3,3', 5'-triyodotironina; T2, 3,3'-diyodotironina. (McNabb y Darras, 2015).

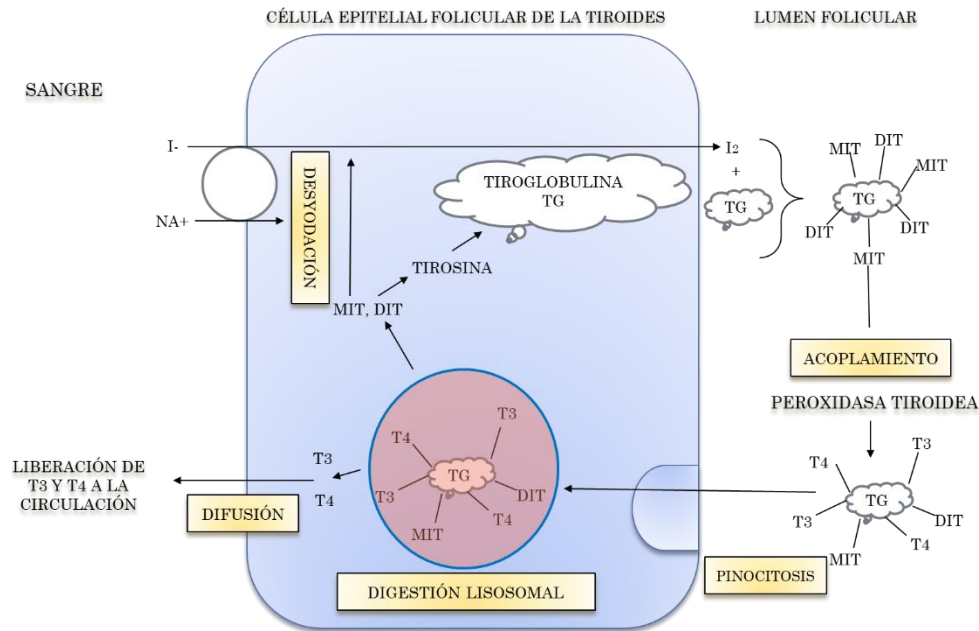


Figura. 3. Síntesis de hormonas tiroideas. Adaptado de Summers y Mcnab, (2017).

En aves adultas con una ingesta adecuada de yoduro, el contenido de hormona tiroidea consiste principalmente en T₄, con cantidades menores o indetectables de T₃. Cuando el yoduro es limitante, la relación T₃:T₄ aumenta y las reservas hormonales totales disminuyen. La tasa de secreción de las hormonas tiroideas (TSR), medidas por un número de métodos, están en el intervalo de 1-3 g T₄ /100 g de peso corporal por día en pollos. Las temperaturas frías aumentan el TSR, mientras que la deficiencia de yoduro y el envejecimiento tienden a disminuir el TSR (Wentworth y Ringer, 1986). Como en otros vertebrados, la mayor parte del control de la función tiroidea se realiza mediante el eje hipotalámico-hipofisario-tiroideo.

Las concentraciones de T₄ exceden las de T₃ en el plasma aviar en varias veces, aunque esta relación es mucho más baja que en la glándula tiroidea. Las aves adultas de muchas especies tienen concentraciones plasmáticas o séricas de T₄ en el rango de 5-15 ng T₄ / ml (6-19 pmol / ml) y concentraciones de T₃ en el rango de 0.5-4 ng T₃ / ml (0.7 –1,5 pmol / ml) (McNabb, 2000).

Los patrones diurnos de las hormonas tiroideas plasmáticas se demuestran fácilmente en las aves. La T4 en plasma se eleva y alcanza su punto máximo durante el período oscuro, y la T3 incrementa y es más alta durante el período de luz, lo que refleja el momento de la mayor conversión extratiroidea de T4 a T3 durante la luz. Los patrones de ingesta de alimentos son un factor clave que influye en la producción y degradación periférica de T3 y en los patrones de las hormonas tiroideas plasmáticas. La temperatura también puede ser importante; las temperaturas frías aumentan y las temperaturas cálidas deprimen la concentración plasmática de T3 dentro de estos patrones diurnos. En general, los efectos de la temperatura sobre la T4 plasmática son opuestos a los de T3, aunque los efectos de T4 son más complejos (Sharp y Klandorf, 1985; Cogburn y Freeman, 1987; Decuyper y Kühn, 1988).

2.2.2 Activación y degradación.

Una vez secretadas por la glándula tiroides, las hormonas tiroideas pueden metabolizarse en los tejidos periféricos por diferentes vías. La desaminación oxidativa y la descarboxilación de la cadena lateral de alanina, así como la escisión del enlace de éter, conducen a una degradación irreversible de las hormonas. La sulfatación y la glucuronidación del grupo hidroxilo fenólico son procesos reversibles que facilitan la solubilidad hormonal y la posterior excreción. Sin embargo, la vía más importante es la desyodación que consiste en la eliminación de un sólo yodo del anillo externo fenólico (5'D u ORD) o del tirosilo o anillo interno (5D o IRD) (Figura. 2), procesos catalizados por enzimas llamadas yodotironina deiodinasas. Dado que las glándulas tiroides aviares secretan predominantemente T4, la mayor parte de la T3 presente en la circulación y los tejidos periféricos se deriva de la ORD extratiroidea de T4 (Darras *et al.*, 2006).

Todas las deiodinasas aviares son selenoproteínas con una selenocisteína en su sitio catalítico. Por lo tanto, dependen de la presencia de un elemento de secuencia de inserción de selenocisteína (SECIS) en la región no traducida 3' de su ARNm para permitir la incorporación de selenocisteína (Bianco *et al.*, 2002). La enzima D1 es una enzima no selectiva que cataliza tanto ORD como IRD. Por el contrario, D2 sólo cataliza ORD, mientras que D3 sólo lo hace con IRD y es una enzima puramente inactivadora (Figura. 2). D1 se expresa altamente en el hígado, riñón e

intestino delgado aviar y contribuye a la producción periférica de T3 y la degradación de rT3. D2 se expresa predominantemente en el cerebro, donde es importante en la conversión local de T4 (que ha entrado en el cerebro) a T3. D3 se encuentra en cantidades variables en casi todos los tejidos de pollo y se cree que protege a las células de la sobreexposición a T3 en situaciones específicas, tales como el desarrollo temprano, la enfermedad y el hambre (Darras *et al.*, 2006).

Las deiodinasas desempeñan papeles importantes en el patrón de las hormonas tiroideas circulantes durante el período peri-eclosión. La expresión de D3 es particularmente alta en el hígado de pollo embrionario. El fuerte descenso de la actividad de D3 hepática en los últimos días antes de la eclosión es el factor importante que contribuye al pico peri-eclosión de T3 circulante (Galton y Hiebert, 1987; Darras *et al.*, 1992). A nivel del cerebro, el aumento en el contenido de T3 alrededor de la eclosión es facilitado por la conversión local mejorada de T4 a T3 por D2 (Darras *et al.*, 2009).

2.2.3 Eje hipotálamo-hipofisiario-tiroideo.

La glándula tiroides aviar se encuentra principalmente bajo el control del eje hipotalámico-hipofisario. El hipotálamo aviar produce diversas hormonas, entre ellas la hormona liberadora de tirotropina (TRH) y la hormona liberadora de corticotropina (CRH) que tienen efectos estimulantes y somatostatina que tiene efectos inhibitorios sobre los tirotrofos en la hipófisis anterior. También se produce la hormona estimulante de la tiroides (TSH, o tirotropina), que es el principal controlador de la producción y liberación de hormonas tiroideas por la glándula tiroides. Las hormonas tiroideas a su vez ejercen una retroalimentación negativa sobre la hipófisis y el hipotálamo.

Históricamente, el control del eje aviar hipotálamo-hipófisis-tiroides, basado en investigaciones de pollos, parecía ser muy similar al de los mamíferos (Decuyper y Kühn, 1988). La estructura de TRH, un tripéptido, es idéntica en todos los vertebrados, y muchos estudios han demostrado que la TRH exógena podría estimular la liberación de TSH de la pituitaria de pollo. Más recientemente, los estudios en aves, anfibios, reptiles y peces han demostrado que la CRH, en lugar de la TRH, es a menudo el estimulador hipotalámico más importante de la TSH hipofisaria en vertebrados no mamíferos. El papel más importante de la TRH para influir en la función tiroidea en las aves parece

ser a través de su hormona de crecimiento (GH) acción liberadora que se traduce en aumentos de T3 circulante a través de la inhibición de la hormona del crecimiento y la degradación de T3 por medio de la deiodinasa tipo 3 (De Groef *et al.*, 2006).

La estructura de la TSH, que es una glucoproteína, difiere en su cadena β en diferentes clases de vertebrados, pero varias TSH heterólogas estimulan la función tiroidea en las aves. La falta de anticuerpos específicos para la TSH aviar significó que gran parte de la comprensión previa del desarrollo del control de la TSH se basó en estudios que utilizaron anticuerpos contra las TSH heterólogas. Durante el desarrollo, el establecimiento del control del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides sobre la glándula tiroides ocurre aproximadamente a mediados de la incubación (días embrionarios 10.5–11.5) en pollos. La eliminación de la pituitaria por decapitación del embrión en el día 9.5 no altera la T4 plasmática hasta el día 11.5, pero impide el incremento de T4 plasmática que se produce después del día 11.5. Estos hallazgos sugieren que se produce suficiente TSH para establecer el control del eje de la tiroides en el día 11.5, pero que el desarrollo previo de la glándula tiroides debe ser autónomo (Thommes *et al.*, 1988). La identificación de la presencia de péptido TSH β y ARNm en esta misma etapa en el desarrollo embrionario ha proporcionado una confirmación altamente específica de estos hallazgos (Ellestad *et al.*, 2011).

2.2.4 Efectos de las hormonas tiroideas.

2.2.4.1 Efectos de las hormonas tiroideas en el desarrollo.

Las hormonas tiroideas influyen en ambos aspectos del desarrollo aviar (crecimiento y diferenciación-maduración). El crecimiento (el aumento de la masa) implica principalmente la proliferación celular (hiperplasia), pero también puede ser el resultado del aumento del tamaño celular (hipertrofia). En general, las hormonas tiroideas parecen actuar permisiva o indirectamente, en concierto con otras sustancias de control, en la estimulación del crecimiento de las aves (McNabb y King, 1993). La principal estimulación hormonal directa del crecimiento corporal se debe a factores de crecimiento circulantes (como el factor de crecimiento similar a la insulina-1(IGF1)) que están principalmente bajo el control de la GH de la hipófisis.

La necesidad de hormonas tiroideas para el crecimiento normal de las aves ha sido demostrada por el crecimiento reducido, asociado con el hipotiroidismo, que resulta de la tiroidectomía o la administración de bociógeno. Sin embargo, dentro del rango fisiológico de las concentraciones circulantes de la hormona tiroidea, hay poca evidencia consistente de la estimulación de la hormona tiroidea del crecimiento general del cuerpo. En los extremos hipertiroideos, el crecimiento está deprimido debido a las altas tasas metabólicas y un cambio hacia el catabolismo (McNabb y King, 1993; McNabb, 2000).

Las hormonas tiroideas son importantes para desencadenar procesos de diferenciación y maduración en muchos tejidos. En el pollo, el receptor TR α se expresa en el neuroectodermo desde el inicio del desarrollo, y la expresión del receptor aumenta durante la neurulación (Flamant y Samarut, 1998). Las hormonas tiroideas están presentes en el cerebro embrionario temprano, y los transportadores, las desiodinasas y los TR muestran un patrón de expresión dinámico y específico de la región a lo largo del desarrollo embrionario (Forrest *et al.*, 1991; Darras *et al.*, 2009; Van Herck *et al.*, 2012). Las hormonas tiroideas son necesarias para el desarrollo de una arquitectura cerebral normal y conexiones neuronales críticas para la función de las redes de señalización, como se muestra, por ejemplo, en el cerebelo de pollo (Bouvet *et al.*, 1987; Verhoelst *et al.*, 2004). Estimulan la maduración de los fotorreceptores en la retina de pollo (Fischer *et al.*, 2011) y probablemente están involucrados en el desarrollo del oído interno (Geysens *et al.*, 2012). Las hormonas tiroideas también son esenciales para el aprendizaje temprano, ya que determinan el inicio del período sensible para la impresión filial y pueden preparar el cerebro para un aprendizaje posterior (Yamaguchi *et al.*, 2012).

En varios tejidos, la estimulación de la diferenciación-maduración por las hormonas tiroideas implica la interacción con otras hormonas. En el intestino embrionario de pollo, las hormonas tiroideas por sí solas pueden estimular la diferenciación celular e inducir enzimas digestivas, pero la combinación con glucocorticoides es necesaria para la maduración del transporte intestinal de glucosa (McNabb *et al.*, 2006). La diferenciación y el crecimiento del músculo esquelético requieren GH y hormonas tiroideas. La GH sola parece ser suficiente para aumentar el peso muscular en pollos hipotiroideos, pero se necesitan ambas hormonas para revertir el efecto sobre la miosina. La aparición de isoformas de miosina específicas críticas para la maduración funcional

durante el desarrollo embrionario tardío también es modulado por T3. Las hormonas tiroideas también interactúan con IGF1 (p.e, en el desarrollo esquelético). Los estudios *in vitro* de cartílagos pélvicos de embriones de pollo tempranos han demostrado que las hormonas tiroideas provocan la diferenciación-maduración del cartílago al estimular la producción de matriz y la osificación. En este caso, T3 estimula la hipertrofia de los condrocitos, pero no influye en la proliferación celular, que solo se estimula en presencia de IGF1 (McNabb y King, 1993; McNabb *et al.*, 2006).

2.2.4.2 Efectos sobre el metabolismo y la termorregulación.

Las hormonas tiroideas controlan esa parte de la producción metabólica de calor endotérmico, que mantiene la temperatura corporal constante en aves y mamíferos homeotérmicos, así como también cambios adaptativos adicionales en la producción de calor estacional (Danforth y Burger, 1984). La mayor producción de calor endotérmico en aves y mamíferos homeotérmicos, en comparación con los vertebrados ectotérmicos inferiores, implica el desacoplamiento del metabolismo aeróbico de la producción de energía como adenosin trifosfato (ATP). Históricamente, los efectos metabólicos estimulados por la hormona tiroidea han sido bien documentados en aves, con hormonas tiroideas exógenas estimulantes y la tiroidectomía o la administración de bociógenos como depresores del consumo de oxígeno (Wentworth y Ringer, 1986). Las alteraciones en las hormonas tiroideas también pueden influir en el suministro de energía metabólica de otras maneras (p.e, los aumentos en las hormonas tiroideas facilitan el almacenamiento de glucógeno en el hígado, y la disminución hormonal conduce al agotamiento del glucógeno y a la disminución de la glucosa en plasma).

Existen diferencias fundamentales en la regulación de la producción de calor endotérmico en mamíferos y aves. En los mamíferos, el tejido adiposo marrón (BAT), que está especializado en la producción de calor, juega un papel clave en la termogénesis, pero las aves no tienen BAT, por lo que esta termogénesis debe ocurrir en otros tejidos. En todas las endotermas, existe un desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones mitocondriales de la producción de ATP, un fenómeno facilitado por las proteínas portadoras de aniones en las membranas mitocondriales internas. La evidencia actual sugiere que, en los mamíferos, la proteína de desacoplamiento 1 (UCP1) es más importante, pero que en las aves la proteína de desacoplamiento clave es el

trinucleótido de adenina translocasa (Walter y Seebacher, 2009), aunque la proteína de desacoplamiento aviar puede desempeñar un papel a través de interacciones que involucran el sistema β adrenérgico (Joubert *et al.*, 2010). Tanto T4 como T3 pueden desempeñar papeles en la producción de calor endotérmico, y estas respuestas pueden ser no genómicas que involucran a T4 o T3, o genómicas que resultan principalmente de la unión de T3 a TR nucleares. La mayor parte de lo que se sabe sobre los efectos no genómicos en la termogénesis se basa en el trabajo en mamíferos, aunque hay algunos estudios en embriones de pollo (Scapin *et al.*, 2009).

El momento del desarrollo de la tiroides y el control del eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides parece ser crítico para el desarrollo de la termorregulación. La maduración del eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides ocurre durante la vida embrionaria tardía, en donde se exhiben respuestas endotérmicas al enfriamiento durante el período peri-eclosión y donde se obtiene la capacidad de mantener temperaturas corporales constantes (homeotermia) como pollitos (McNabb *et al.*, 1998). Los embriones de pollo pueden exhibir algunas respuestas endotérmicas tardías en la incubación. En el período peri-eclosión es el inicio de la respiración pulmonar, la maduración de las partes del cuerpo involucradas en la ruptura del cascarón, la retracción del saco vitelino y las demandas metabólicas de las actividades de eclosión. Las hormonas tiroideas son necesarias para la maduración de los pulmones y la producción de tensioactivos en el inicio de la respiración pulmonar, y para una serie de aspectos de la maduración funcional muscular (es decir, acciones genómicas de las hormonas tiroideas). Es en este momento que las aves muestran aumentos dramáticos en las hormonas tiroideas. Esto argumenta que el pico precocial de hormonas en la circulación está relacionado principalmente con el inicio de respuestas endotérmicas al enfriamiento (es decir, principalmente acciones no genómicas) que aparecen en el período peri-eclosión. También sugiere que los otros eventos de maduración estimulados por las hormonas tiroideas durante el período peri-eclosión implican acciones específicas de tejidos y órganos, pero no requieren altas concentraciones circulantes de hormona tiroidea. Los roles exactos del eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides y sus interacciones con el eje hipotalámico-hipofisario-adrenocortical aún no se han aclarado (Debonne *et al.*, 2008).

2.2.5 Influencias ambientales sobre la función tiroidea.

Los cambios en la temperatura y la disponibilidad de alimentos parecen ser los factores ambientales naturales que tienen la mayor influencia en la función tiroidea. El enfriamiento ambiental puede actuar a través del eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides para aumentar la liberación de hormona tiroidea, lo cual puede alterar las vías de desyodación de la hormona tiroidea periférica y aumentar la renovación de la hormona (Wentworth y Ringer, 1986). En general, estos cambios proporcionan una mayor disponibilidad de hormona tiroidea en asociación con los aumentos metabólicos necesarios para la homeotermia a temperaturas ambiente frías. Las concentraciones de T4 plasmática a menudo cambian relativamente poco (proporcionalmente es menor que los cambios de T3) con exposición prolongada al frío, lo que sugiere que la respuesta del eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides es menos importante que los cambios en las vías de desyodación (Rudas y Pethes, 1984). En general, las temperaturas calientes tienen el efecto contrario (es decir, deprimen la función tiroidea) (Sharp y Klandorf, 1985). Sin embargo, los matices de los efectos genómicos y no genómicos sobre el metabolismo y los roles relativos de T4 y T3 en la estimulación metabólica no se han investigado completamente en las aves.

Al igual que el cambio de temperatura, la disponibilidad de alimentos altera el estado de la tiroides. Tanto la alimentación programada como la inanición causan disminución en las concentraciones circulantes de T3, aunque los efectos sobre T4 son más variables (Darras *et al.*, 1995). Hay algunas diferencias en los detalles de los efectos de la tiroides y las causas relativas de esos efectos (función del eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides versus cambios en la desyodación) con el hambre versus la alimentación programada y en diferentes clases de vertebrados. En las aves, tanto la inanición como la alimentación programada sostenida de alimentos conducen a una disminución de T3 circulante y a un aumento de T4. La causa principal de la disminución de la circulación de T3 es porque incrementa la degradación de T3 por D3 IRD, sin cambios en la conversión de T4 a T3 por D1 (Darras *et al.*, 1995). La alimentación, al aumentar la T3 circulante, parece ser uno de los factores clave que juegan un papel en los patrones diurnos de las concentraciones plasmáticas de la hormona tiroidea. Del mismo modo, puede ser un factor importante en algunos cambios inducidos por la temperatura en la hormona tiroidea; por ejemplo,

la disminución de las concentraciones plasmáticas de T3 en pollos expuestos a temperatura de 40 ° C puede deberse en gran medida a la disminución del consumo de alimentos a altas temperaturas (Williamson *et al.*, 1985).

2.2.6 Hormonas tiroideas y SA.

Como se mencionó en las secciones anteriores, la función tiroidea es un mecanismo regulador importante de la tasa metabólica, es posible hipotetizar que la selección temprana para mejorar la CA podría resultar en hipotiroidismo funcional, ya sea por disminución de la producción de la hormona tiroidea o cambio en el metabolismo periférico de la T4. Buys *et al.* (1993) proporcionaron la primera evidencia de que la susceptibilidad a SA está relacionada con el metabolismo de la hormona tiroidea. Además, los trastornos metabólicos como el hipotiroidismo causan síndrome de hidropericardio, y el hipertiroidismo funcional inducido artificialmente mediante la suplementación de T3 en la dieta resulta en mayor mortalidad por SA (Decuypere *et al.*, 1994; Luger *et al.*, 2002). Se cree que las aves susceptibles a SA son limitadas en su producción de T4 (Scheele *et al.*, 1991, 1992). La actividad insuficiente de la hormona tiroidea para regular el metabolismo, se relaciona con el fondo genético, por lo tanto, será especialmente evidente en bajas temperaturas ambientales (Scheele *et al.*, 1992; Özkan *et al.*, 2006). Buys *et al.* (1999) y Hassanzadeh *et al.* (2010) indicaron que el hipotiroidismo observado en líneas de pollos que combinan una favorable CA y un rápido crecimiento juega una parte importante en la reducción del consumo de oxígeno que conduce a anoxia, falla cardíaca y SA. Existe además una relación entre las hormonas tiroideas y los parámetros anatómicos. Malan *et al.* (2003) demostraron que una deficiencia de la hormona tiroidea podría afectar el desarrollo pulmonar y puede aumentar el riesgo de SA en pollos de rápido crecimiento. Lo anterior ha sido confirmado por Hassanzadeh *et al.* (2004, 2005b, 2008) quienes documentaron una correlación directa entre el desarrollo del corazón y los pulmones post-eclosión con la actividad embrionaria de la hormona tiroidea. Estos datos mostraron, que los pollos post-eclosionados tuvieron menor peso del corazón y los pulmones en relación con el tamaño de su cuerpo cuando los niveles plasmáticos de hormona tiroidea se observaron más bajos durante el desarrollo embrionario. En consecuencia, estas aves con menor

capacidad pulmonar tenían una mayor susceptibilidad a SA cuando se exponen a bajas temperaturas e hipoxia crónica generada por elevada altitud (Hassanzadeh *et al.*, 2008). Luger *et al.* (2001) y Özkan *et al.* (2006) encontraron una marcada depresión de las hormonas T3 y T4 en pollos que fueron que presentaban SA. Se sabe que el estado de enfermedad provoca cambios significativos en el metabolismo de la hormona tiroidea. Estos cambios se conocen colectivamente como síndrome de enfermedad no tiroidea (NTIS), que se caracteriza por una T3 sérica baja y, en casos graves, también una T4 sérica deprimida sin el aumento esperado de TSH. Los cambios observados durante el NTIS difieren entre la fase aguda y crónica de la enfermedad. La fase aguda se caracteriza por una rápida disminución de la T3 circulante. Esto se debe a una disminución en las proteínas de unión de las hormonas tiroideas y la actividad de unión, junto con una mayor transformación de hormona tiroidea que se debe en parte a cambios en la actividad de las desyodasas (Van der Spek *et al.*, 2017). Durante el proceso de enfermedad existe una disminución de T3 sérica y un aumento de rT3 debido a una desyodación alterada de T4 (Maiden y Torpy, 2019). La función de D1 en el hígado disminuye y contribuye principalmente a la eliminación deteriorada de rT3. La expresión y actividad reducida de D2 provoca la disminución de T3 y aumento de rT3. La actividad de D3 no se detecta normalmente en tejido sano, pero aumenta significativamente y explica la inactivación de T3 (y conversión de T4 a rT3). Los cambios en las vías de desyodación ocurren rápidamente durante el proceso de la enfermedad y se manifiesta mucho antes de la alteración de otros componentes del eje tiroideo (Maiden y Torpy, 2019). En la fase crónica de la enfermedad, se ha observado una disminución de la T4 sérica, TSH sérica baja por una pérdida de pulsatilidad en la secreción de TSH y una disminución de la expresión de TRH hipotalámica en individuos críticamente enfermos, lo que indica una regulación a la baja del eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroide (Van der Spek *et al.*, 2017).

2.3 ESTRÉS OXIDATIVO Y DAÑO OXIDATIVO.

2.3.1 Definición.

El estrés oxidativo es una alteración en el balance oxidante-antioxidante a favor de los primeros. El daño oxidativo por su parte, es el daño biomolecular causado por el ataque de los radicales libres sobre los constituyentes de los organismos vivos (Halliwell y Gutteridge, 2015). Surai *et al.* (2019) mencionan que existen dos términos introducidos en el concepto de estrés oxidativo “eustres oxidativo”, que se refiere al estrés oxidativo fisiológico de bajo nivel, y “distres oxidativo”, que se refiere al estrés oxidativo de alto nivel.

2.3.2 Radicales libres (RL).

Los radicales libres, son moléculas que contienen uno o más electrones no apareados y son capaces de existir de forma independiente (Ryter y Choi, 2013). La mayoría de los RL son derivados del oxígeno (especies reactivas de oxígeno) o ROS y derivados del nitrógeno (especies reactivas de nitrógeno) o RON (Estévez, 2015).

En general, el antagonismo de los RL a las enzimas y antioxidantes en el cuerpo en estados fisiológicos puede mantener el equilibrio de la producción y eliminación de ROS. En cuanto al mecanismo de reacción en el estrés oxidativo, cualquier oxidante puede inducirla en un ambiente excesivo. ROS es el oxidante más importante para iniciar la reacción de estrés oxidativo. Por lo que, una sobreproducción de ROS socava el equilibrio oxidación-antioxidante y desencadena la respuesta que puede conducir a una reacción inflamatoria y daño tisular (Wang y Dong, 2018). Las ROS se forman donde hay enfermedades y daño celular y se producen especialmente en grandes cantidades durante un proceso infeccioso (Mandelker, 2011). Incluso se producen en condiciones normales desde las mitocondrias, las cuales producen energía en forma de ATP, a través de un proceso de múltiples pasos que acopla la fosforilación oxidativa y el flujo de electrones mediante la cadena transportadora de electrones. Este proceso involucra cinco complejos proteicos (complejos I – IV de la cadena respiratoria y el complejo ATP-sintasa), dos transbordadores (coenzima Q y citocromo C) y una serie de reacciones redox por medio de las cuales se transfieren electrones a lo largo de los complejos de la cadena respiratoria hasta el complejo IV, donde el

oxígeno molecular se reduce a agua. Además, el flujo de electrones a lo largo de los complejos induce la liberación de protones en el espacio intermembranal de la mitocondria, con la generación posterior de un gradiente electroquímico que impulsa la síntesis de ATP a nivel del complejo ATP-sintasa (complejo V). Se ha estimado que generalmente 1–2% del O₂ total se reduce parcialmente a O₂^{•-}. El anión superóxido se produce esencialmente en las mitocondrias a nivel del complejo I y III, y su producción está relacionada con la fuga de electrones de la cadena transportadora de electrones que causa la reducción parcial de oxígeno molecular a O₂^{•-} en lugar de agua. Las ROS mitocondriales también pueden afectar directamente la funcionalidad de los complejos de la cadena transportadora de electrones al oxidar sus centros de hierro y azufre, lo que exacerba la producción de ROS (Incalza *et al.*, 2018).

Por lo tanto, incluso en animales sanos, hasta el 25% del oxígeno que respiran forma RL. Sin embargo, en animales enfermos, hasta el 75% del oxígeno puede formarlos. Los electrones libres producidos bajo el metabolismo aeróbico normal de las células son fácilmente aceptados por el oxígeno para producir ROS, tal como oxígeno singlete, superóxido (O₂^{•-}), radical hidroxilo (HO[•]) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Winterbourn y Hampton, 2008). Los estudios han evaluado las principales fuentes de ROS en varias líneas celulares en condiciones hipóxicas y concluyeron que la fuente predominante de ROS en el sistema cardiovascular es el complejo enzimático *nicotinamida adenina dinucleótido fosfato* (NADPH) *oxidasa* (NOX), que prevalece sobre otros sistemas generadores de ROS, como las mitocondrias y la xantina oxidasa (Higtgen *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2016). Las NADPH oxidasas comprenden una compleja familia multicomponente de proteínas transmembrana y citosólicas que usan NADPH como donante de electrones para reducir el oxígeno molecular al anión superóxido y a peróxido de hidrógeno.

NADPH oxidasa se conocía anteriormente como gp91phox y se describió por primera vez en leucocitos (Hancock *et al.*, 2011); sin embargo, es importante destacar que los estudios posteriores caracterizaron a siete miembros de la familia de NOX (NOX1 a 5 y oxidasas dobles 1 y 2) con diversas distribuciones entre tejidos y órganos específicos (Bache *et al.*, 2014), desde entonces, estos miembros de la familia NOX se han descrito en células no fagocíticas, incluidas neuronas, músculo esquelético, miocitos, hepatocitos, células endoteliales, células hematopoyéticas, células madre y cardiomiocitos (Yu *et al.*, 2016) por ejemplo, estudios previos encontraron que los

cardiomiocitos de rata estimulados con angiotensina II (Ang II) activaron directamente el complejo NADPH oxidasa, específicamente la isoforma NOX2. Este complejo NOX2 puede activarse en organismos sanos por varios factores, incluido un agonista del receptor de proteína G y endotelina-1 (ET-1), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y estrés mecánico por rozamiento del flujo sanguíneo. Sin embargo, la activación patológica de NOX2 (p. e, citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa) puede dar lugar a la generación de concentraciones mucho más altas de ROS que parecen contribuir a estados patológicos, como disfunción endotelial, hipertrofia miocárdica, fibrosis, insuficiencia cardíaca, inflamación, aterosclerosis, enfermedad arterial coronaria, accidente cerebrovascular y fibrosis renal y pulmonar (Bache *et al.*, 2014). Los estudios del sistema vascular han demostrado que la isoforma predominante del complejo NADPH es NOX4 (Siques *et al.*, 2014; Barman *et al.*, 2014), y las investigaciones previas revelaron que NOX4 está involucrado en la detección de oxígeno, control vasomotor, angiogénesis, fibrosis, proliferación celular, diferenciación, migración, apoptosis y senescencia. Se ha informado una expresión elevada de NOX4 en una serie de enfermedades cardiovasculares, incluidas la aterosclerosis, la fibrosis pulmonar, la insuficiencia cardíaca y el accidente cerebrovascular isquémico (Chen *et al.*, 2012). Sin embargo, se ha documentado que el análisis del ARNm total de pulmón o vía aérea reveló la presencia de una cantidad sustancial de NOX isoforma 2 (NOX2), doble oxidasa (DUOX) 1 y DUOX2, y bajas cantidades de NOX1 y NOX4 (Lasségue y Griendling, 2010). Además, en el pulmón, la expresión de NOX se origina principalmente de macrófagos pulmonares reclutados (NOX2), aunque otras isoenzimas NOX / DUOX se expresan principalmente en células no fagocíticas dentro del pulmón como el epitelio de las vías respiratorias, las células endoteliales pulmonares, los fibroblastos y las células musculares lisas. (Lasségue y Griendling, 2010).

Bajo estrés oxidativo, los altos niveles de ROS producen cambios en la célula a través de los siguientes mecanismos: (1) activando proteínas quinasas sensibles a redox, como JAK (Janus quinasa), PKC (Proteína quinasa), PI3K (fosfatidilinositol-3-quinasa) y PDK (quinasa dependiente de 3-fosfoinositida). (2) activar a los miembros de la familia de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), como Akt (serina/treonina proteína quinasa), JNKs (c-Jun quinasa N-terminal), Erk1/2 (quinasa regulada por señal extracelular) y p38, que están involucrados en la angiogénesis

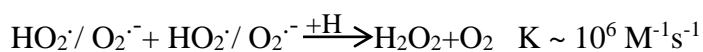
y la proliferación, diferenciación, migración, crecimiento, motilidad, supervivencia y apoptosis de la angiogénesis. (3) alterar la actividad de los factores de transcripción sensibles a redox, como AP-1 (proteína activadora 1), NF- κ B (factor de necrosis- κ B), HIF-1 α (Factor inducible por hipoxia 1 α) y STAT (señal transductor y activador de la transcripción). (4) inhibir la proteína tirosina fosfatasa (PTP), que produce altos niveles de proteínas fosforiladas. (5) produciendo un aumento en la concentración de calcio intracelular (Ca²⁺). (6) produciendo efectos directos sobre las estructuras celulares, como enzimas, receptores y canales iónicos, o generando efectos indirectos sobre estas estructuras a través de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), que son altamente susceptibles a ROS, de modo que la descomposición oxidativa de los n-3 PUFA pueden comprometer la dinámica de la matriz lipídica de la membrana y, por lo tanto, la estructura y función de las proteínas asociadas a la membrana, como las enzimas, los receptores y los transportadores; y (7) estimular la actividad y la expresión de moléculas proinflamatorias y pro-oncogenes (Siques *et al.*, 2018). No obstante, la investigación actual sugiere que ROS y sus productos de reacción pueden mediar la señalización celular como intermediarios, participando así en respuestas moleculares adaptativas o desadaptativas, que incluyen crecimiento celular, diferenciación, apoptosis y necrosis (Saugstad, 2010; Incalza *et al.*, 2018). Además, ROS estimula los factores de crecimiento de las células vivas y elimina las proteínas disfuncionales a través de la oxidación, desempeñando un papel vital en el mantenimiento de las funciones fisiológicas normales de varios orgánulos (Zuo *et al.*, 2015).

2.3.3 Especies reactivas de oxígeno (ROS).

2.3.3.1 Superóxido ión radical (O₂⁻/HO₂[·]).

Ésta especie posee diferentes propiedades dependiendo del medio ambiente y el pH. Debido a su pKa de 4.8, el superóxido puede existir en forma ya sea de O₂⁻ o, a pH bajo, en forma de hidropéroxilo (HO₂[·]) (Bieski y Cabelli, 1995; Schafer y Buettner, 2001; Halliwell y Gutteridge, 2015). Éste último, puede penetrar más fácilmente las membranas biológicas que la forma cargada. Por lo tanto, el hidropéroxilo puede considerarse una especie importante, aunque bajo un pH fisiológico la mayor parte del superóxido está en su forma cargada.

En un ambiente hidrofílico tanto el $O_2^{\cdot-}$ como el HO_2^{\cdot} Pueden actuar como agentes reductores capaces, por ejemplo, de reducir iones férricos (Fe_3) a iones ferrosos (Fe_2); sin embargo, la capacidad reductora del HO_2^{\cdot} es más alto. En disolventes orgánicos la solubilidad de $O_2^{\cdot-}$ es más alta y su capacidad para actuar como agente reductor se incrementa. También actúa como un poderoso nucleófilo, capaz de atacar centros con carga positiva, y como agente oxidante que puede reaccionar con compuestos capaz de donar H^+ (por ejemplo, ascorbato y tocoferol). La reacción más importante de los radicales superóxidos es la dismutación; en esta reacción, el radical superóxido reacciona con otro radical superóxido. Uno se oxida a oxígeno y el otro se reduce a peróxido de hidrógeno (Bielski *et al.*, 1985).



Aunque la tasa constante de ésta reacción espontánea es baja, puede llegar a ser mucha más alta en pH ácido donde el hidroperoxilo se forma radical.

2.3.3.2 Radical Hidroxilo (OH^{\cdot}).

La reactividad del radical hidroxilo es extremadamente alta (Von Sonntag, 1987; Bielski y Cabelli, 1995; Halliwell y Gutteridge, 2015). A diferencia de los radicales superóxido que se consideran relativamente estables y tienen una reacción constante, aparentemente con tasas de reacción bajas con componentes biológicos. Los componentes hidroxilo son especies de corta vida que poseen alta afinidad hacia otras moléculas. El OH^{\cdot} es un potente agente oxidante que puede reaccionar a una tasa alta con la mayoría de las moléculas celulares orgánicas e inorgánicas, incluyendo ADN, proteínas, lípidos, aminoácidos, azúcares y metales. Las 3 reacciones químicas principales de los radicales OH^{\cdot} incluye abstracción de hidrogeno, así como adición y transferencia de electrones (Halliwell y Gutteridge, 2015). El OH^{\cdot} es considerado el radical más reactivo en los sistemas biológicos; debido a su alta reactividad, interactúa en el sitio de su producción con las moléculas que lo rodean de cerca.

2.3.3.3 Peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

El resultado de la dismutación de los radicales superóxido es la producción de H₂O₂. Hay algunas enzimas que pueden producir H₂O₂ directa o indirectamente. Aunque las moléculas de H₂O₂ se consideran metabolitos de oxígeno reactivo, no son radicales por definición; sin embargo, pueden causar daño a la célula a una concentración relativamente baja (10µM). Se encuentran disueltos libremente en solución acuosa y puede penetrar fácilmente las membranas biológicas. Sus efectos químicos nocivos pueden ser divididos en las categorías de actividad directa, procedente de sus propiedades oxidantes y actividad indirecta en la que sirve como fuente de especies más nocivas, como el radical OH· o HClO. Las actividades directas de H₂O₂ incluyen la degradación de las proteínas hemo; liberación de hierro; inactivación de enzimas; y oxidación ADN, lípidos, grupos SH y cetoácidos (Halliwell y Gutteridge, 2015).

2.3.4 Sistema antioxidante.

Como primer nivel de defensa contra los oxidantes, la célula está equipada con una red llamada sistema antioxidante. Los antioxidantes son capaces de donar electrones a oxidantes, por lo que apagan su reactividad en condiciones controladas y los hacen inofensivos para las macromoléculas celulares. Los antioxidantes se convierten en radicales, pero son mucho más estables y no son capaces de inducir daño celular. Los antioxidantes oxidados se reciclan posteriormente a su estado activo reducido por una serie de procesos celulares eficientes alimentados por la energía del NADPH. Este reciclaje es la clave del poder de la red antioxidante, que de otro modo se deterioraría rápidamente. La red antioxidante se puede clasificar en dos grupos principales, los antioxidantes de bajo peso molecular o sistema antioxidante no enzimático, como la vitamina C, E y Glutación (GSH) y de alto peso molecular (enzimáticos) como superóxido dismutasa (SOD), tiorredoxina (Trx), catalasa (CAT) y glutación peroxidasa (GSH-Px) (Lykkesfeldt y Svendsen, 2007).

2.3.4.1 Vitamina C.

El también llamado ácido ascórbico o ascorbato es una cetolactona con dos grupos hidroxilo ionizables, tiene dos pK_a, pK₁ es de 4.2 y pK₂ de 11.6. (Du *et al.*, 2012). El único producto de oxidación de electrones del ascorbato es el radical monodehidroascorbato (MDHA) y este es

probablemente el determinante clave de su papel biológico. Debido a la estabilización de resonancia, el MDHA no reacciona fácilmente con el oxígeno u otras moléculas para generar más radicales reactivos y, por lo tanto, es muy eficaz como eliminador de radicales. El ascorbato reacciona con radicales generados biológicamente como el superóxido, radicales tocoferoxilo y radicales alcoxilo / peroxilo con constantes de velocidad $>10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Por lo tanto, a una concentración suficientemente alta, el ascorbato podría complementar la SOD en la eliminación de superóxido *in vivo* y tiene el potencial de regenerar tocoferol a partir de radicales tocoferoxilo *in vivo* (Smirnoff, 2018). Para los pollos, la primera línea de defensa contra las especies reactivas de oxígeno es el ácido ascórbico. Estrictamente los pollos de engorda no requieren ácido ascórbico de fuentes dietéticas debido a su capacidad innata para sintetizarlo primordialmente en los riñones (Leeson y Summers, 2001) a través del ciclo de la 6-glucoronatexilulosa-xilulosa en presencia de L-gulonolactona oxidasa (Gan *et al.*, 2018); por lo tanto, su suplementación en la dieta no se practica. Sin embargo, ciertas condiciones ambientales o patológicas pueden aumentar sus requisitos más allá de la capacidad de sintetizarla (Pardue y Thaxton, 1986). Enkvetchakul *et al.* (1993) demostraron que los niveles de ácido ascórbico en los pulmones y el hígado eran bajos en pollos de engorda con SA alojados en un entorno con poca ventilación durante 7 semanas.

2.3.4.2 Vitamina E.

Las formas naturales de vitamina E son ocho moléculas lipofílicas, que incluyen α -, β -, γ - y δ -tocoferol (α T, β T, γ T, δ T) y α -, β -, γ - y δ -tocotrienol (α TE, β TE, γ TE, δ TE). Todas las formas de vitamina E tienen un anillo de cromanol y una cadena lateral 16-carbonilo, en la cual los tocoferoles están saturados y los tocotrienoles tienen tres enlaces dobles. Las diferentes isoformas de tocoferoles y tocotrienoles difieren en la posición 5 o 7 del anillo de cromanol con un grupo H o CH₃. Los tocoferoles naturales tienen la configuración *RRR* en las posiciones 2, 4' y 8', y los tocotrienoles tienen la configuración *R* en la posición 2 (Jiang, 2014).

Todas las formas de vitamina E son potentes antioxidantes, ya que eliminan los radicales peroxilo lipídicos al donar hidrógeno del grupo fenólico en el anillo de cromanol (Jiang *et al.*, 2001). Por otro lado, se ha sugerido que los tocotrienoles son mejores que α T en la eliminación de radicales peroxilo debido a una distribución más uniforme de los tocotrienoles en la bicapa de fosfolípidos

y una interacción más efectiva con los radicales peroxilo lipídicos que los tocoferoles en entornos de membrana (Packer *et al.*, 2001; Wong y Radhakrishnan, 2012).

A diferencia de las capacidades similares de donación de hidrógeno, las formas naturales de vitamina E que poseen una posición 5 no sustituida, como γ T, pueden atrapar electrófilos, incluidas las especies reactivas de nitrógeno, que aumentan durante la inflamación. Por otra parte, esta actividad no la posee la vitamina E con un grupo metilo en la posición 5, como la α T (Jiang *et al.*, 2001). Como resultado, se muestra que γ T es superior a α T en la desintoxicación de NO_2 y peroxinitrito a través de la formación de 5-nitro- γ T (Cooney *et al.*, 1993; Cooney *et al.*, 1995; Christen *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 2001). Además de los tocoferoles y tocotrienoles, se ha demostrado que el 13'-hidroxicromanol y el 13'-carboxicromanol de δ T y δ TE tienen potentes actividades antioxidantes al prevenir la peroxidación lipídica *in vitro*. En comparación con α T, estos compuestos exhiben una actividad de eliminación de radicales ligeramente más fuerte (Terashima *et al.*, 2002). Fellenberg y Speisky (2006) publicaron una revisión detallada de los antioxidantes en la nutrición de las aves de corral y concluyeron que la suplementación dietética con vitamina E en niveles que exceden los requerimientos nutricionales mejoró el sistema de defensa antioxidante de las aves y disminuyó el estrés oxidativo.

2.3.4.3 Glutación (GSH).

El glutación (L-g-glutamyl-L-cisteinyl-glicina) es un tripéptido hidrosoluble formado por los aminoácidos ácido glutámico, cisteína y glicina (Meister, 1988; Townsend *et al.*, 2003). Dicha molécula es un antioxidante celular esencial, que está presente en todos los órganos y tejidos, especialmente en el hígado, donde se encuentran las mayores concentraciones (Kaplowitz *et al.*, 1985; Meister, 1988; Townsend, 2003). La molécula se encuentra libre y unida a proteínas. La concentración total de glutación (GSHt) es la suma de la fracción de glutación libre y la fracción de glutación unida a proteínas. A su vez, la fracción libre está integrada por la forma tiol reducida llamada glutación reducido (GSH) y la forma oxidada o disulfuro llamada glutación oxidado (GSSG). La forma reducida GSH es la forma activa de la molécula, es la más abundante y se le encuentra en el interior de las células en concentraciones milimolares en el rango de 0,1 a 10 Mm (Meister, 1988; Townsend *et al.*, 2003), en tanto que extracelularmente se encuentran niveles

micromolares de GSH (Pastore *et al.*, 2003). El grupo activo de la molécula está representado por el grupo tiol (-SH) del residuo de cisteína.

La función antioxidante de la GSH ocurre de la siguiente manera: El peróxido de hidrógeno formado durante el metabolismo aeróbico es metabolizado formando GSSG. La reacción ocurre por la acción de la enzima glutatión peroxidasa, tanto en el citosol como en la mitocondria y también por la enzima catalasa que está ausente en la mitocondria. El GSSG formado luego es reducido para formar nuevamente GSH por acción de la enzima GSH reductasa usando NADPH, formando así un ciclo de óxido-reducción. Los peróxidos orgánicos (ROOH) pueden ser reducidos por dos enzimas, la enzima glutatión peroxidasa o la enzima GSHT-transferasa. En condiciones de estrés oxidativo severo, la habilidad de la célula para reducir GSSG a GSH se encuentra superada, tendiendo entonces a la acumulación de GSSG. Para evitar un cambio en el equilibrio redox intracelular, GSSG es activamente transportado fuera de la célula o bien reacciona con los sulfidrilos de las proteínas para formar disulfuros mixtos (PSSH) (Lu, 2009).

2.3.4.4 Superóxido dismutasa (SOD).

La SOD es la primera enzima de desintoxicación y el antioxidante más poderoso en la célula (Ighodaro y Akinloye, 2018).

Las SOD son metaloproteínas que dismutan el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2) (Mruk *et al.*, 2002).

Según el cofactor metálico que albergan, los SOD se pueden clasificar en cuatro grupos: SOD de hierro (FeSOD), SOD de manganeso (MnSOD), SOD de cobre-zinc (CuZnSOD) y SOD de níquel (NiSOD). MnSOD es el SOD que se encuentra típicamente en las mitocondrias y también se puede encontrar en los peroxisomas, y CuZnSOD es generalmente el SOD más abundante y se puede encontrar en el citosol y en el espacio extracelular. Estas enzimas son, por lo tanto, bastante ubicuas en los organismos aeróbicos (Abreu y Cabelli, 2010).

El mecanismo general por el cual funcionan los SOD se ha denominado mecanismo de “ping-pong”, ya que implica la reducción secuencial y la oxidación del centro metálico, con la oxidación y reducción concomitantes de radicales superóxido a velocidades controladas por difusión que

generalmente incluye un rango de pH (aproximadamente 5-9.5) donde la tasa no cambia (Abreu y Cabelli, 2010). La enzima es indispensable para la salud celular, ya que protege las células del organismo de los radicales excesivos de oxígeno, los radicales libres y otros agentes nocivos que promueven la muerte celular. Los niveles de SOD disminuyen con la edad, mientras que aumenta la formación de radicales libres (Ighodoro y Akinloye, 2018).

2.3.4.5 Tiorredoxina (Trx).

Entre los sistemas biológicos, ciertos aminoácidos proteicos han demostrado ser sensibles al oxígeno molecular o sus derivados. La histidina, la metionina, la cisteína (Cys), el triptófano y la tirosina son particularmente vulnerables a la modificación oxidativa. La oxidación de Cys en proteínas resultó ser de particular importancia ya que el grupo tiol puede pasar por modificaciones oxidativas reversibles que afectan la estructura y función de la proteína. El sistema Trx evolucionó como un componente redox clave en los tres reinos biológicos: funciona en las reacciones de intercambio disulfuro de ditiol con una variedad de proteínas, controlando así las principales vías en diferentes condiciones fisiológicas (Balsera y Buchanan, 2019). Los enlaces disulfuro de proteínas se reducen al nivel de sulfhidrilo principalmente por el sistema de tiorredoxina, que está compuesto por un sustrato reducido, una tiorredoxina reductasa (TR) y tiorredoxina (Trx), una proteína disulfuro de bajo peso molecular. Tras la transferencia de equivalentes reductores del sustrato reducido a Trx catalizado por TRs, Trx distribuye el reductor a objetivos seleccionados a través de un intercambio ditiol-disulfuro que da como resultado la modificación estructural y funcional de una proteína objetivo.

Los objetivos del sistema Trx son diversos, pero destaca como sistema antioxidante regenerando las enzimas antioxidantes tales como 2-Cys peroxirredoxinas y en la reparación del daño oxidativo de reciclaje de enzimas tales como la metionina sulfóxido reductasa. El sistema Trx está ampliamente distribuido y probablemente diversificado durante la evolución, lo que resulta en una variación en la naturaleza y de sus componentes entre los organismos y permite la adaptación a diversas condiciones ambientales y necesidades funcionales (Balsera y Buchanan, 2019).

2.3.4.6 Catalasa (CAT).

CAT es una proteína tetramérica de 240 kilodaltons (kDa) con cuatro subunidades similares. CAT es una enzima antioxidante común presente en casi todos los tejidos vivos que utilizan oxígeno. La enzima utiliza hierro o manganeso como un cofactor y cataliza la degradación o reducción de H₂O₂ en agua y oxígeno molecular, en consecuencia, de completar el proceso de desintoxicación imitado por SOD (Marklund, 1984; Chelikani *et al.*, 2004). Es abundante en las células, donde continuamente busca moléculas de peróxido de hidrógeno. CAT es altamente eficiente; puede descomponer millones de moléculas de peróxido de hidrógeno en un segundo. La enzima se encuentra principalmente en los peroxisomas.

La actividad de CAT se lleva a cabo en dos pasos. Una molécula de peróxido de hidrógeno oxida el hemo a una especie de oxiferrilo. Se genera un radical catión porfirina cuando se elimina un equivalente de oxidación del hierro y uno del anillo de porfirina. Una segunda molécula de peróxido de hidrógeno actúa como un agente reductor para regenerar la enzima en estado de reposo, produciendo una molécula de oxígeno y agua (Chelikani *et al.*, 2004).

2.3.4.7 Glutación peroxidasa (GSH-Px).

GSH-Px, es una importante enzima intracelular que desglosa los peróxidos de hidrógeno a agua; y peróxidos lipídicos a sus correspondientes alcoholes principalmente en las mitocondrias y a veces, en el citosol. Su actividad depende de un cofactor, el Selenio. Por esta razón, GSH-Px a menudo se conoce como selenocisteína peroxidasa. La enzima juega un papel crucial en la inhibición del proceso de lipoperoxidación y, por lo tanto, protege a las células del estrés oxidativo (Ighodoro y Akinloye, 2018). La familia GSH-Px incluye al menos ocho miembros, y cuatro de ellos (GSH-Px1, GSH-Px2, GSH-Px3 y GSH-Px4) se encuentran en las aves, sin embargo, la GSH-Px1 y GSH-Px4 han recibido la mayor atención (Surai *et al.*, 2018).

Como se mencionó anteriormente, GSH-Px es responsable de la desintoxicación de hidroperóxidos y peróxido de hidrógeno en las siguientes reacciones:

Estas reacciones emplean el mecanismo de ping-pong, por ejemplo, SeCys en el centro activo de la enzima se oxida con una formación de ácido selenénico, que se reduce de nuevo por una reacción con dos moléculas de GSH. El átomo de Se en el sitio catalítico de la enzima experimenta un ciclo

redox que implica al anión selenolato en su forma activa, lo que reduce H_2O_2 y peróxidos orgánicos (Mugesh y Singh, 2000). Recientemente, se ha desarrollado un modelo matemático y un esquema catalítico unificado con la incorporación del mecanismo de regulación del pH de GSH-Px, que confirmó que GSH-Px sigue el mecanismo de ping-pong descrito (Pannala *et al.*, 2014). GSH-Px se caracteriza por una alta especificidad para GSH como donante de un equivalente reductor (sustrato) y cataliza la reducción de una variedad de hidroperóxidos. Es interesante notar que la tiorredoxina se puede usar, además de GSH, como sustrato reductor, y GSH-Px4 puede usar otras proteínas tioles como equivalentes reductores (Brigelius-Flohé y Maiorino, 2013). Sin embargo, la actividad de GSH-Px1 está relacionada sólo con peróxidos libres y no es capaz de reducir los hidroperóxidos de ácidos grasos esterificados. Por lo tanto, los hidroperóxidos en las membranas deben ser liberados por otros sistemas enzimáticos (p. e, fosfolipasas) u otro miembro de la familia GSH-Px, por ejemplo, GSH-Px4 puede tratarlos.

La actividad de GSH-Px depende del estado de Se de los tejidos. De hecho, se ha demostrado que la suplementación dietética con Se es efectiva para aumentar el GSH-Px en una variedad de especies animales, incluyendo los pollos, (Flohé y Brigelius-Flohé, 2016). Cuando se dispone de Se, el aumento de la actividad de GSH-Px podría proporcionar un mecanismo compensatorio para lidiar con las condiciones de estrés.

La respuesta más temprana en la actividad específica de GSH-Px dependiente de Se ocurre en el plasma de pollo ocho horas y en el hígado 24 horas después de la administración (Bunk y Combs, 1980). Es importante destacar que se encontró GSH-Px en el proteoma del huevo de gallina (Mann y Mann, 2008). Se demostró que la actividad de GSH-Px tiene especificidad de especie y tejido. Por ejemplo, se comprobó que GSH-Px en el músculo del miembro posterior del ratón era casi 10 veces mayor que el del músculo del pollo (Omeye y Tappel, 1974). Tappel *et al.* (1982) realizaron un estudio exhaustivo de GSH-Px en diversos tejidos de diferentes animales donde las actividades totales de GSH-Px encontradas en el estudio del hígado, corazón y pulmón de pollo fueron 33, 27 y 10 nmol de NADPH oxidada / min / mg de proteína, respectivamente.

2.3.5 Estrés oxidativo y elevada altitud.

El estrés oxidativo durante la hipoxia puede sonar paradójico; sin embargo, la exposición a hipoxia hipobárica o a gran altitud conduce a una reducción de la saturación de oxígeno arterial debido a una caída de la presión parcial de oxígeno (PO₂), desencadenando varios efectos fisiológicos y/o patológicos (Figura 4) (Siques *et al.*, 2018).

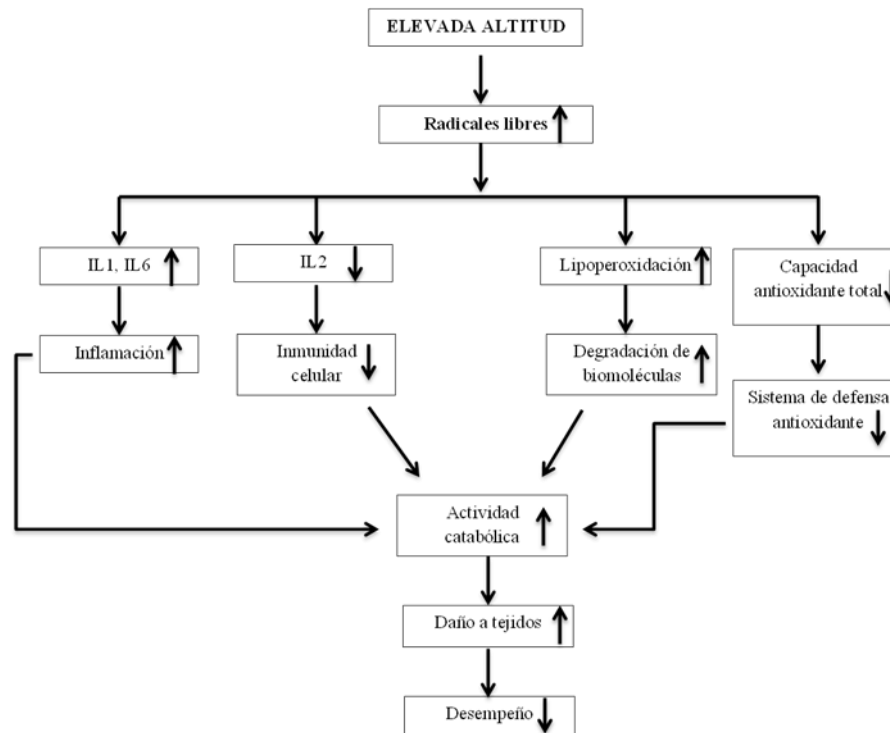


Figura. 4. Efectos fisiopatológicos de la crianza del pollo de engorda a elevada altitud.

Adaptado de Kalía *et al.* [2017]

Cuando se produce una disponibilidad extremadamente baja de oxígeno, como durante la isquemia o la exposición a una presión de oxígeno muy baja, como una elevada altitud, las células hipóxicas tienden a generar ATP a través de la glucólisis anaerobia (Miyata *et al.*, 2010), esta reacción ocurre mediante la interacción de dos ADP, que son catalizados por la adenilato quinasa. Este proceso también genera AMP, que no se puede reciclar, se cataboliza y se forma hipoxantina. En presencia de proteasas relacionadas con calcio, la xantina deshidrogenasa se puede convertir a xantina

oxidasa, que utiliza oxígeno molecular en lugar de NAD^+ como aceptor de electrones, con la consiguiente producción de xantina, más anión superóxido o H_2O_2 . El sistema de xantina deshidrogenasa / oxidasa es un potente generador de ROS durante las condiciones de hipoxia. No obstante, en un estudio reciente Bautista-Ortega *et al.* (2014) descubrieron que las aves sometidas a hipoxia hipobárica simulada de 3000 msnm de altitud, presentaban una reducción en la actividad de xantina oxidasa (XO) en tejido pulmonar, los autores explican que XO juega un doble papel ya que además de producir anión superóxido, también participa en la producción de ácido úrico (AU), que actúa como antioxidante natural, por lo tanto, en un intento por equilibrar el estado de estrés oxidativo producido por las condiciones de hipoxia hipobárica condujo al sistema antioxidante a agotar la actividad de XO al producir más AU. La exposición intermitente a gran altitud tiene características similares a la isquemia (Radak *et al.*, 1994). Por otro lado, el patrón cambiante de ROS y óxido nítrico es diferente durante la isquemia y la exposición a gran altitud (Schneider *et al.*, 2001). A diferencia de la isquemia, los niveles de ROS aumentan durante la hipoxia y asumen valores pre-hipóxicos al regresar a la normoxia. Por otra parte, la exposición prolongada a la elevada altitud resulta en una disminución de la actividad y contenido de las proteínas de la SOD mitocondrial en el músculo esquelético de ratas (Radak *et al.*, 1994). El decremento del nivel de proteína Mn-SOD significó que la exposición intermitente a gran altitud también afectó la transcripción de las enzimas.

Además, se ha reportado una disminución de la GSHPx hepática a elevada altura, lo que sugiere que el hígado podría ser especialmente sensible al estrés oxidativo inducido por la altitud (Nakanishi *et al.*, 1995). También, la exposición a gran altitud disminuye el nivel de glutatión reducido (GSH) y aumenta la concentración de glutatión oxidado (Ilavazhagan *et al.*, 2001; Joanny *et al.*, 2001). Por lo tanto, parece que la capacidad de los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos disminuye a gran altitud.

2.3.6 Mecanismo de defensa celular contra la hipoxia.

La defensa contra la hipoxia depende del factor inducible por hipoxia (HIF) (Semenza, 2003; Marx, 2004) que activa una gran gama de genes que estimulan la eritrocitosis, angiogénesis, metabolismo de la glucosa o proliferación/supervivencia celular para finalmente proteger los

tejidos hipóxicos. HIF-1 α se transcribe constitutivamente y se traduce en cultivos celulares. In vivo, la hipoxia o la isquemia induce la expresión de ARNm de HIF- α (Wiener *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1998; Bergeron *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000; Bosh-Marcé *et al.*, 2007). Su degradación, dependiente de la tasa de oxígeno, determina su nivel. En presencia de oxígeno, HIF- α se somete a hidroxilación enzimática por prolilo hidroxilasas (PHDs) (Epstein *et al.*, 2001; Schofield y Ratcliffe, 2004). HIF hidroxilado es entonces reconocido por la proteína supresora de tumores Hippel-Lindau (pVHL) (Ivan *et al.*, 2001; Hon *et al.*, 2002) que actúa como una ubiquina ligasa E3 y es degradado rápidamente por el proteosoma (Maxwell *et al.*, 1999; Ohh *et al.*, 2000). Durante la hipoxia, el HIF-1 α no hidroxilado escapa a la interacción con pVHL y entonces se estabiliza. Después de unirse a HIF-1 β principalmente en el núcleo (Eguchi *et al.*, 1997), transactiva los genes involucrados en la adaptación al estrés hipóxico-isquémico. Se han identificado tres isoformas de la subunidad HIF- α (HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α). HIF-1 α y HIF-2 α son estructural y funcionalmente similares. En contraste HIF-3 α carece de las estructuras para la transactivación presentes en el COOH-terminal de HIF-1 α y HIF-2 α y puede jugar un rol alternativo como regulador negativo de la expresión génica inducible por hipoxia (Makino *et al.*, 2002). Estudios recientes en ratones, utilizando la interrupción génica de HIF-1 α o HIF-2 α , han divulgado que éste último actúa como un regulador fisiológico de la eritropoyetina (Takeda *et al.*, 2008), además estas dos subunidades juegan un papel crucial en la defensa contra el estrés oxidativo (Kojima *et al.*, 2007; Aragonés *et al.*, 2008). Peng *et al.* (2013) realizaron un experimento en el que sometieron a bajas temperaturas a pollos de engorda que fueron divididos en dos grupos: al primero se le asignó una dieta alta en energía metabolizable (EM) y al otro grupo (control) una concentración normal de EM. En este experimento reportan que a los 28 días de edad la expresión relativa de ARNm de HIF-1 α en el corazón fue elevada en comparación con el control y los niveles de ARNm de CuZn-SOD, ARNm de Mn-SOD y ARNm de GSH-Px1 disminuyeron significativamente lo que indica que las aves estaban sometidas a estrés oxidativo por hipoxia. En otro estudio, Zhang *et al.* (2013) desafiaron a un grupo de pollos mediante exceso de inclusión de sal para desencadenar síndrome ascítico que se sabe está involucrado con el estrés oxidativo y la hipoxia, en esta investigación cuantificaron la expresión de ARNm de HIF-1 α en corazones y pulmones de las aves, y

determinaron que su abundante expresión en el grupo expuesto al exceso de sal respecto al control era evidencia de que dicho factor está asociado al SA en pollos de engorda. Por otra parte, Zhang *et al.* (2007) reportan que los embriones de pollo de la meseta Qinghai-Tibetana pueden aumentar la expresión de HIF-1 α para adaptarse al entorno hipóxico.

2.3.7 Estrés oxidativo y SA.

El SA es causado por un aumento del flujo sanguíneo o una mayor resistencia de éste en el pulmón (Julian y Wilson, 1986). Durante la hipoxia, varios mecanismos aumentan la producción de RL, incluidos el peróxido de lípidos, el peróxido de hidrógeno y el superóxido. Esto se ve respaldado por el hecho de que las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), como indicadores de la lipoperoxidación celular, aumentaron en más del 100% en el corazón y el hígado de los pollos de engorda afectados por el SA en comparación con las aves control (Díaz-Cruz *et al.*, 1996). En un estudio reciente, Bautista-Ortega *et al.* (2014) reportaron que XO y NOX son fuentes importantes de H₂O₂ en las proximidades del endotelio de la arteria pulmonar en aves que experimentaban hipoxemia debido a la altura de 3000 msnm. También encontraron que las aves con signos clínicos de SA (liquido en cavidad abdominal y una relación ventrículo derecho:ambos ventrículos >0.27) mostraron una mayor formación de peroxinitrito en el endotelio vascular y sus alrededores que en pollos clínicamente sanos.

El daño tisular secundario en la hipoxia atrae a los glóbulos blancos, que a su vez liberan más RL, causando más estragos (Halliwell y Gutteridge, 1990; Bottje *et al.*, 1995). Enkvetchakul *et al.* (1993) observaron infiltración celular inflamatoria en varios tejidos de pollos con SA. Una hipótesis alternativa sobre la causa de la mortalidad en el SA es el daño del músculo cardíaco debido a la acumulación anormal de peróxido de hidrógeno mitocondrial (Maxwell *et al.*, 1996). Esta hipótesis respalda los hallazgos según los cuales los cambios en la permeabilidad de la membrana sarcolemal, debido a la lipoperoxidación, condujeron a la acumulación de calcio en las mitocondrias (Shen y Jennings, 1972), en los pollos con SA, había evidencia ultraestructural de una sobrecarga de calcio en las mitocondrias de sus cardiomiocitos (Maxwell *et al.*, 1993). Por lo tanto, la lipoperoxidación puede desarrollarse durante el SA porque el estado antioxidante de las

aves se ve comprometido (Enkvetchakul *et al.*, 1993). Estos cambios pueden contribuir a la entrada de calcio y modificaciones en la permeabilidad de las membranas mitocondriales y, en consecuencia, a la deposición de peróxido de hidrógeno en la matriz mitocondrial de los cardiomiocitos. La producción basal de peróxido de hidrógeno, como indicador de fuga de electrones, fue mayor en las mitocondrias de la pechuga y los músculos cardíacos de las aves que padecen SA que en los controles, y las diferencias en la fuga de electrones en las mitocondrias de los músculos se magnificaron por la inhibición del transporte de electrones en el Complejo I y III. La actividad del Complejo I fue menor en las mitocondrias del músculo cardíaco de las aves con SA en comparación con los controles, pero no hubo diferencias en la actividad del Complejo II. Por lo tanto, las mitocondrias aisladas del músculo cardíaco de aves con SA exhibieron defectos específicos del sitio en el transporte de electrones dentro del Complejo I y III que podrían contribuir a un acoplamiento de la cadena respiratoria inferior. Estos hallazgos prueban el uso celular ineficiente del oxígeno que puede contribuir al desarrollo del SA en pollos de engorda (Tang *et al.*, 2002).

La acidosis también afectará la integridad de la membrana celular y reducirá la eliminación de radicales libres, lo que exacerbará el efecto negativo de éstos. Se han informado valores más altos de lipoperoxidación en plasma de pollos de engorda con SA. Enkvetchakul *et al.* (1993) y Bottje *et al.* (1995) demostraron un estado antioxidante deteriorado, así como niveles más bajos de tocoferol y glutatión pulmonar y hepático en pollos de engorda con SA. Además, se encontró generación de radical hidroxilo en pollos de engorda con SA inducida experimentalmente usando exposición a baja temperatura o administración de hormona T3. Se sugirió que las especies reactivas de oxígeno, como los iones OH⁻, pueden estar involucradas en la patogénesis del SA en pollos de engorda (Arab *et al.*, 2006). La teoría de los radicales libres sobre la patogénesis del SA está respaldada por los hallazgos de que los antioxidantes dietéticos son útiles en la prevención del SA, pero solo en dosis altas. Por ejemplo, la alimentación de una dieta que contiene 87 mg/kg de vitamina E fue ineficaz (Bottje *et al.*, 1997) pero con alto contenido de vitamina E (250 mg/kg) y selenio (0.3 mg/kg, en forma de selenometionina) disminuyó la incidencia del SA en pollos (10% vs. 0.9%) después de una exposición a corto plazo a estrés por calor (Roch *et al.*, 2000). En otros estudios, la adición de vitamina C a 500 mg kg⁻¹ redujo la mortalidad por SA inducida por

temperaturas ambientales frías y la alimentación con una hormona tiroidea (Ladmakhi *et al.*, 1997; Xiang *et al.*, 2002).

3. JUSTIFICACIÓN.

Teniendo en cuenta estas investigaciones se evaluó si la alimentación programada era capaz de controlar el síndrome ascítico, afectar las hormonas tiroideas y si era capaz de evitar un cuadro de estrés oxidativo al preservar el sistema antioxidante en pollos de engorda criados a elevada altura (2250 msnm).

4. HIPÓTESIS.

La alimentación programada controla las manifestaciones del síndrome ascítico, afecta el estado tiroideo y modifica la respuesta de los indicadores de estrés oxidativo en pollos de engorda criados a elevada altura (2250 msnm).

5. OBJETIVOS GENERALES.

Determinar si la alimentación programada evita un cuadro de estrés oxidativo en pollos criados a elevada altura.

Determinar el efecto de la alimentación programada sobre los parámetros productivos.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Evaluar el efecto de la alimentación programada sobre las manifestaciones del síndrome ascítico.
- Evaluar el efecto de la alimentación programada sobre las hormonas tiroideas.
- Determinar el efecto de la alimentación programada sobre los siguientes indicadores de estrés oxidativo en corazón y pulmón de las aves: Lipoperoxidación, capacidad antioxidante total, actividad de glutatión peroxidasa y concentración de ácido ascórbico total.

7. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1 Ubicaciones

El experimento se realizó en la granja “La Consentida” en el municipio de Tepetlaoxtoc, Edo. Mex, a 2250 metros de altura sobre el nivel del mar, con autorización de la empresa “Avigrupo México, SA de CV” y del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación (CICUAE) de la FMVZ-UNAM. Las pruebas de hormonas tiroideas se realizaron en el laboratorio certificado de análisis clínicos “Quetxal SA de CV” y las mediciones de los indicadores de estrés oxidativo en el laboratorio del Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica (DNAB) de la FMVZ-UNAM.

7.2 Animales, instalaciones y protocolo de alimentación programada.

1600 pollos machos estirpe Ross 308 de 7 días de edad fueron repartidos aleatoriamente en 4 tratamientos o alimentaciones programadas: AP100 (100% de consumo de alimento), AP90 (90% de consumo de alimento), AP80 (80% de consumo de alimento) y AP70 (70% de consumo de alimento). Las alimentaciones programadas fueron calculadas respecto a los consumos recomendados en el manual de objetivos de rendimiento de Aviagen® (Aviagen® USA, 2014). Cada tratamiento contó con 5 corrales de 80 pollos cada uno. La unidad experimental fue el corral, el cual medía 2 m × 2.5 m para obtener una densidad inicial de 16 aves/m². En los primeros 7 días de vida, los pollitos fueron alojados en un sólo grupo y alimentados a libre acceso. Los corrales experimentales fueron instalados dentro de una caseta de producción donde los pollos se criaron sobre piso de concreto cubierto con cascarilla de arroz. El ambiente se controló mediante un sistema de extractores y ventilación tipo túnel (Chore Tronics® USA). Con una curva de temperatura inicial de 32°C al día 1 de edad y paulatinamente un descenso de 2°C por semana hasta la semana 6. La temperatura, el CO₂ y la humedad se monitorearon las 24 hrs del día con el sistema Farm on Line de Skov®, (Skov®, Dinamarca) todos los días que duró el experimento. Se suministró luz continua, 23 horas de luz / 1 hora de oscuridad durante los primeros 15 días. A partir del día 16 se suministraron 16 horas de luz / 8 horas de oscuridad. El agua se ofreció a libre acceso mediante un

sistema automatizado de bebida a razón de 11 aves por niple y el alimento se suministró manualmente en comedero de bote a razón de 26.6 aves por comedero. El experimento duró 35 días a partir del día 7 de edad.

7.3 Dietas

A las aves se les otorgó una dieta comercial elaborada a base de maíz y pasta de soya formuladas para que cumplieran con los requerimientos de las tablas para aves de Rostagno *et al.* (2017). Los alimentos fueron; pre iniciador del día 1 al día 10 de edad con una energía metabolizable (EM) de 3052 Kcal/kg y proteína cruda de 22.5%. Iniciador del día 11 al 21 con una EM de 3102 Kcal/kg y proteína cruda de 20.54%. Engorda de los 22 a los 35 días con una EM de 3161 Kcal/kg y proteína cruda de 18.5%. Finalizador de los 36 a los 42 días con una EM de 3260 Kcal/kg y proteína cruda de 17.5%. Los dos primeros alimentos fueron en presentación de migaja y los dos últimos en forma de pellet.

7.4 Parámetros productivos.

El consumo de alimento se midió diariamente y el peso corporal de las aves se registró semanalmente. La mortalidad se clasificó todos los días para conocer la causa y registrar la incidencia de SA. Las aves muertas fueron pesadas. Se obtuvieron dos conversiones alimenticias, una ajustada por mortalidad en la que se contabiliza tanto la carne producida en animales vivos como en animales muertos y la conversión alimenticia comercial que se obtuvo como el cociente de los kilogramos de alimento necesario para obtener 1 kilogramo de carne viva, finalmente, se midió el factor de eficiencia europeo (FEE) y los kg producidos.

7.5 Diagnóstico de SA.

Durante el experimento las aves muertas fueron diagnosticadas con SA según la acumulación de líquido en la cavidad abdominal y pericardio así como la hipertrofia del lado derecho del corazón [Peso del ventrículo derecho /Peso de ambos ventrículos, (VD:AV)] un valor > 0.29 fue considerado como animal con SA (Izadinia *et al.*, 2010; Ahmadipour *et al.*, 2019). Además, a los

42 días de edad se tomaron 3 aves por tratamiento para el análisis de hipertrofia del ventrículo derecho, un valor >0.27 fue considerado como animal con SA (Julian, 1993; Zhou *et al.*, 2008).

7.6 Hematocrito y hormonas tiroideas (T3 y T4).

A los 42 días se tomaron muestras de sangre de 3 aves por corral, mediante venopunción de la vena radial del ala. Una parte se depositó en tubos capilares con heparina, los cuales se centrifugaron en una micro centrifuga SOL-BAT (México) por 7 min a 14000 rpm para determinar el hematocrito (HC) y otra parte se depositó en tubos vacutainer y se centrifugó a 3000 rpm por 10 min en una centrifuga Becton Dickinson (USA) para obtener el plasma y determinar la concentración de hormonas T3 y T4 por inmunoensayo de quimioluminiscencia (CLIA) (Eshratkhah *et al.*, 2011) utilizando kits comerciales Beckman Coulter (Beckman Coulter, Brea CA, USA) y un analizador Beckman Coulter DXi 800 (Beckman Coulter, Brea CA, USA).

7.7 Saturación de hemoglobina con oxígeno (saturación HbO₂).

Se tomaron 5 aves de 42 días de edad por corral para un total de 25 aves por tratamiento para medir el porcentaje de saturación de hemoglobina con O₂ en sangre arterial (saturación HbO₂) usando un oxímetro veterinario portátil Nonin 8600 V (Nonin Medical Inc, Plymouth, MN) con un sensor de transfectancia 2000 T (Nonin Medical Inc, Plymouth, MN). Las aves se colocaron ligeramente en decúbito lateral y el sensor del oxímetro se posicionó en el ala derecha, para iluminar el tejido entre el radio y la ulna (Wideman *et al.*, 2000b).

7.8 Indicadores de estrés oxidativo.

A los 7, 21 y 42 días de edad se sacrificaron, humanitariamente mediante dislocación cervical, 5 aves por tratamiento para extraer el corazón y los pulmones, los cuales fueron conservados a -40°C para posteriormente determinar en ellos los indicadores de estrés oxidativo: Lipoperoxidación, medida mediante la prueba de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), actividad de glutatión peroxidasa (GSH-Px), capacidad antioxidante (FRAP) y vitamina C.

7.8.1 Lipoperoxidación.

Ésta se midió mediante la prueba de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Ohkawa *et al.*, 1979). El malondialdehído (MDA) es un producto secundario de la oxidación de los ácidos grasos de 3 o más dobles ligaduras, que reacciona con el ácido tiobarbitúrico en un medio ácido y a una temperatura alta. El producto de la reacción tiene un color rosa-naranja que absorbe luz entre 532-535 nm. Es importante precisar que existen otros aldehídos, producidos en la oxidación de ácidos grasos, que al igual que el MDA reaccionan con ácido tiobarbitúrico, por lo que en conjunto se les llama TBARS (Hoyland y Tylor, 1991).

En tubos de centrífuga, alícuotas de 100 ul se transfirieron por duplicado de cada homogenado de corazón y pulmón, y se mezcló con 1 ml de ácido tiobarbitúrico al 0.8% en solución acuosa y 2 ml de ácido acético al 20% (pH ajustado a 2.5). Los tubos se mantuvieron en ebullición por 60 minutos y se enfriaron en hielo durante 5 minutos, posteriormente se les agregó 5 ml de n-butanol y se agitaron vigorosamente para luego centrifugarse 15 minutos a 4000 rpm. Los sobrenadantes se leyeron en un espectrofotómetro a 532 nm para obtener sus absorbancias. La concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico en las muestras se calcularon usando curvas patrón de MDA (entre 10 y 80 uM). El MDA se obtuvo de la hidrólisis de 1,1,3,3-tetraethoxipropano en HCl 0.1N durante 12 horas a temperatura ambiente (Gutteridge, 1975); una molécula de 1,1,3,3-tetraethoxipropano produce 1 molécula de MDA, por lo que la molaridad se mantiene (Marnett *et al.*, 1979). Los resultados se reportan en nmol de malondialdehído por mg de proteína presente en la muestra (nmol MDA/mg de proteína).

7.8.2 Actividad de la enzima glutatión peroxidasa

La actividad de GSH-Px, presente en una muestra biológica, se determina mediante el acoplamiento de reacciones en el que se monitoriza, por unidad de tiempo y en condiciones definidas, la concentración de NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido) a 340 nm:



2. $\text{GSSG} + \text{NADPH} \rightarrow 2\text{GSH} + \text{NADP}$ (GRc)

En la primera reacción la enzima GSH-Px presente en la muestra cataliza la transformación de GSH (glutación reducido) a GSSG (glutación oxidado) utilizando H_2O_2 como segundo sustrato. En la segunda reacción el GSSG es restaurado a GSH por acción de la enzima glutación reductasa (GRc) con el consumo de NADPH. De este modo la desaparición de NADPH es proporcional a la concentración de GSSG formado y dependiente de GSH-Px de la muestra. Hay que tener en cuenta que la actividad enzimática se mide en función de la actividad de sustrato consumido o producto generado por unidad de tiempo en condiciones específicas. Una forma de expresar la actividad es la unidad (U) el cual es definido como $\mu\text{mol}/\text{min}$, sin embargo, esta medida no es aceptada por el SI que establece el Katal (kat) y que se define como mol/seg .

Se procedió a centrifugar los homogenados a 10,000 gravitaciones durante 30 minutos. A partir de los cuales se obtuvo el sobrenadante el cual se analizó. Directamente en las celdas se colocaron 800 μl de la Mezcla de Reacción (MR) la cual contenía Buffer de fosfatos, NADPH, Glutación Reducido y Glutación Reductasa. Adicional a la MR se colocaron 100 μl de muestra, las cuales se trabajaron por duplicado, para el caso de la celda control (C) se utilizaron 100 μl de la solución buffer. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente para que los reactivos alcanzaran un equilibrio. Una vez alcanzado el equilibrio se agregaron 100 μl de H_2O_2 y se leyó a 340 nm (Lectura Inicial). Después de 5 minutos se efectuó una nueva lectura (Lectura Final). El resultado final se calculó de la siguiente manera:

$$AC = (A^{\text{ini}} - A^{\text{fin}}) / \text{Tiempo (min)}$$

$$AP = (A^{\text{iniPD}} - A^{\text{finPD}}) / \text{Tiempo (min)}$$

Donde:

A^{ini} = absorbancia inicial del control

A^{fin} = absorbancia final del control

A^{iniPD} = promedio de la absorbancia inicial de la prueba y su duplicado

A^{finPD} = promedio de la absorbancia final de la prueba y su duplicado

AC = absorbancia del control por minuto

AP = absorbancia de la prueba por minuto

A continuación, sustituir los valores en la siguiente fórmula:

$$\text{umol de NADPH/min/L} = (\text{AN} \times 1000 \times \text{VT}) / (6.22 \times \text{VM}) *$$

Donde:

AN = absorbancia neta por minuto

AP-AC VT = volumen total de la cubeta = 1 (ml)

VM = volumen de la muestra 0.1 (ml)

6.22 = coeficiente de absortividad mM (mmol/L). Derivado del coeficiente de absortividad molar 6220 ó 6.22 X 10³

1000 = factor numérico necesario para que los resultados sean en umol/L

Es importante ajustar las unidades, para el caso de homogenados debe emplearse la siguiente fórmula:

$$\text{umol/min/mg ó U/mg} = (\text{Resultado}*/1000)/\text{CP}$$

Donde:

CP = concentración de proteína en la muestra (mg/ml)

7.8.3 Capacidad antioxidante total (FRAP)

La capacidad antioxidante se midió mediante la prueba de poder antioxidante por reducción férrica (FRAP) (Benzie y Strain, 1996; Katalinic *et al.*, 2005; Halliwell y Gutteridge, 2007). El fundamento de esta prueba es que los antioxidantes presentes en la muestra impiden la oxidación de un sustrato mediante una reacción redox en donde el oxidante se reduce a expensas del

antioxidante. Es importante mencionar que esta técnica omite a los antioxidantes que actúan mediante quelación o desactivación enzimática. Los antioxidantes de la muestra reducen al Fe (III) en un medio ácido transformándolo en Fe (II), el mismo que en presencia de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) forma un complejo de color azul cuya absorbancia se puede medir a 593 nm.

Alícuotas de 100 μ l se tomaron por duplicado de cada muestra de homogenado de corazón y pulmones que a su vez se llevó a una dilución 1 en 5; a cada una se les agregó 1.5 ml de una mezcla formada por una solución amortiguadora de acetato 300 mM a pH 3.6, una solución acuosa de cloruro férrico hexahidratado (Fe (III)) 20 mM y 2,4,6-tripiridil-s-triazina 10 mM (disuelto en HCl 40 mM), en una relación 10:1:1 respectivamente. Las muestras se incubaron en agitación a 37 °C por 15 min y se obtuvieron las absorbancias en un espectrofotómetro a 593nm. Las muestras, los tubos de ensayo y las soluciones con 2,4,6-tripiridil-s-triazina se protegieron de la luz todo el tiempo. Para calcular los resultados se realizaron curvas patrón con diferentes concentraciones (de 0.2 a 1.6 mM) de ácido 6-hidroxi-2-(5,7,8-trimetilcroman-2-carboxílico) (trolox); derivado hidrosoluble de la vitamina E. De tal manera que la formación de Fe (II) debida a los antioxidantes reductores de la muestra se comparó con la formación debida al trolox en la curva patrón. Por lo que los resultados se reportan como nmol equivalentes a trolox por mg de proteína presente en la muestra (nmol Eqtrolox/mg de proteína).

7.8.4 Determinación de ácido ascórbico.

Se usó el reactivo Folin-Ciocalteu concentración 2.0 M diluido con agua bidestilada, ácido tricloroacético al 10% y solución de ácido ascórbico.

Para 0.4 ml de homogenizado de tejido se adicionó 1.6 ml de ácido tricloroacético al 10%. Luego de agitar vigorosamente los tubos, se mantuvieron éstos en hielo durante 5 min, después de ser centrifugados durante 5 min a 3000 rpm. Para la estimación de ácido ascórbico, fue utilizado 1 ml del extracto anterior y después 0.1 ml de reactivo de folin diluido fue añadido al extracto, los tubos fueron vigorosamente agitados. Después de 10 min se midió la absorbancia del color azul desarrollado en un espectrofotómetro. Se preparó una curva patrón tomando 0.5-0.7 ml de la solución estándar de ácido ascórbico en agua (5-70 μ g) y se estimó como ya se ha mencionado.

Para verificar la posible interferencia de otros compuestos, se añadieron 50µg de cada compuesto a la mezcla de ensayo antes de la estimación (Jagota y Dani, 1982).

7.8.5 Determinación de proteína.

La concentración de proteína de las muestras se determinó mediante el ensayo de azul de Coomassie con albúmina de suero bovino como estándar (Bradford, 1976).

7.9 Análisis estadísticos.

Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANDEVA). Para probar la normalidad de los datos se usó la prueba Anderson-Darling (Pettitt, 1977) y para probar la homogeneidad de varianzas se usó la prueba de Levene (Gastwirth *et al.*, 2009). Cuando se detectaron diferencias en el ANDEVA se usó la prueba de Tukey para comparar las medias (Herrera-Haro y García-Artiga, 2011). Adicionalmente se realizaron contrastes polinómicos ortogonales para conocer la naturaleza de las respuestas ya sea lineal o cuadrática, se calculó el coeficiente de determinación (R^2) y la ecuación de predicción correspondiente (Herrera-Haro y García-Artiga, 2011). Los datos de mortalidad general, mortalidad por SA e incidencia de SA no presentaron normalidad por lo que se utilizó una prueba de Kruskal-Wallis. Al detectarse diferencias se usó la prueba de Nemenyi para discriminación de medias (Hollander *et al.*, 2014). Los resultados de hormonas T3, T4, HC, medidas cardiacas e indicadores de estrés oxidativo fueron transformados por raíz cuadrada arco seno para alcanzar la normalidad (Herrera-Haro y García-Artiga, 2011). Las declaraciones de significancia estadística se basaron en $P < 0.05$. Se utilizó el paquete estadístico R versión 3.1.3 (R Core Team, 2015).

8. RESULTADOS.

8.1 Incidencia de SA y mortalidad

La mortalidad por causas distintas a SA estuvo en un margen aceptable (<5%) por lo que se excluyó del análisis. En los grupos con AP80 y AP70 se redujo considerablemente la mortalidad total, la mortalidad por SA y la incidencia de SA ($P<0.05$) en comparación con los grupos con AP100 y AP90 (Cuadro 2). La mortalidad por SA fue observada a partir del día 21 de edad en el grupo con AP100 y en el grupo con AP90 (Fig. 5). Del mismo modo el aumento de la mortalidad general comenzó a observarse a los 21 días (Fig. 6).

Cuadro 2. Distribución de mortalidad total, mortalidad por SA e incidencia total de SA acumulada a 42 días en los diferentes niveles de alimentación programada.

Alimentación programada	Mortalidad Total* %	Mortalidad por SA* %	Incidencia total SA* %
AP100	20.75 ^a	17.75 ^a	85.54 ^a
AP90	13.00 ^a	10.25 ^a	78.84 ^a
AP80	4.25 ^b	1.00 ^b	23.52 ^b
AP70	3.25 ^b	0.75 ^b	23.07 ^b
P- valor	0.0013	0.0015	0.0017
EE	13.22	13.22	13.22

*Prueba de Kruskal –Wallis y prueba de Nemenyi post-hoc.

EE= Error estándar.

^{a,b} Diferente literal en la misma columna indica diferencias estadísticamente significativas, $P<0.05$

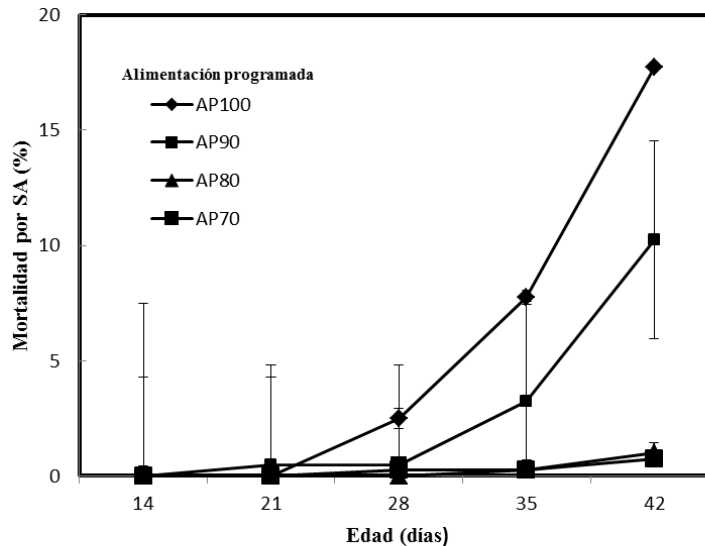


Fig 5. Efecto de la alimentación programada sobre la mortalidad por SA a diferentes edades (entre 14 y 42 días).

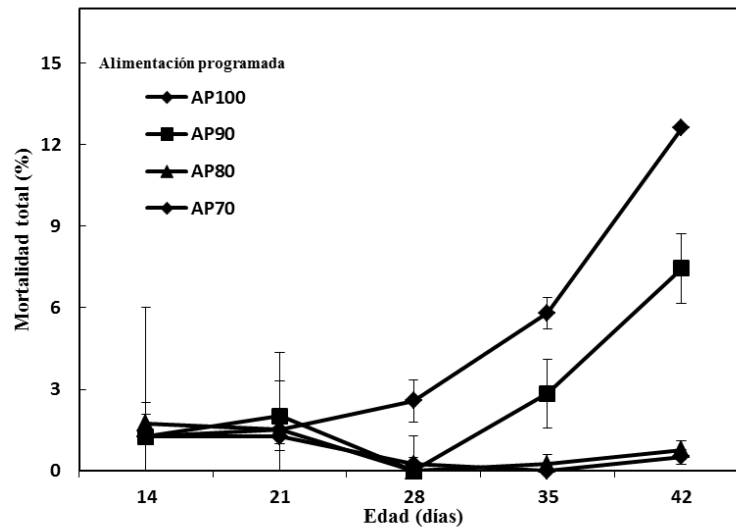


Fig 6. Efecto de la alimentación programada sobre la mortalidad total a diferentes edades (entre 14 y 42 días).

8.2 Parámetros productivos.

Como se muestra en el Cuadro 3, las aves en AP90, AP80 y AP70 tuvieron una reducción de peso corporal del día 14 al día 42 de manera lineal ($P < 0.0001$) con respecto al tratamiento AP100. El promedio diario de consumo de alimento (Cuadro 4) fue disminuyendo significativamente entre los cuatro tratamientos (*Lineal*, $P < 0.0001$) durante los 42 días del experimento a excepción del intervalo de edad de 7 a 14 y de 29 a 35 días donde el tratamiento AP100 y AP90 fueron iguales. En el Cuadro 5 se observa que la conversión alimenticia ajustada por mortalidad (es decir, la que considera el peso de pollos vivos y muertos) disminuye linealmente ($P < 0.0001$) conforme se aplica gradualmente la alimentación programada, el mismo efecto se observó en la conversión alimenticia comercial ($P < 0.0001$) (Cuadro 6). En la Figura 7 se muestra el factor de eficiencia europeo (FEE), en donde se puede observar que los tratamientos AP80 y AP70 fueron muy superiores a los tratamientos AP100 y AP90 ($P < 0.05$). En el tratamiento AP80 se produjeron más kg de carne viva en comparación con los otros tratamientos ($P < 0.05$) (Fig. 8).

Cuadro 3. Efecto de la AP sobre el PC (g) a diferentes edades.

Alimentación programada	PC (g)					
	7d	14d	21d	28d	35d	42d
AP100	144.8	381.4 ^a	872.2 ^a	1441.0 ^a	2133.4 ^a	2771.8 ^a
AP90	144.8	382.0 ^a	832.8 ^b	1420.8 ^b	2057.8 ^b	2644.0 ^b
AP80	146.6	381.2 ^a	806.6 ^c	1349.4 ^c	1974.2 ^c	2575.0 ^c
AP70	144.2	358.4 ^b	743.8 ^d	1257.4 ^d	1796.8 ^d	2350.0 ^d
P-valor	0.546	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0012
EEM	0.593	2.768	8.542	18.010	30.610	45.699
Contrastes polinómicos ortogonales						
Lineal	1.0	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0003
Cuadrático	0.337	0.003	<0.001	0.037	0.0423	0.456
R ²	0.000	0.418	0.745	0.784	0.838	0.950

PC= Peso Corporal.

EEM=Error Estándar de la Media.

^{a,b,c,d} Diferente literal en la misma columna indica diferencias estadísticamente significativas, $P < 0.05$ $y = 13.35 x + 1450.5$ (PC a los 42 días).**Cuadro 4.** Efecto de la AP sobre el PDCA (g/d) a diferentes intervalos de edad.

Alimentación programada	PDCA (g)					
	7 a 14 d	15 a 21 d	22 a 28 d	29 a 35 d	36 a 42 d	7 a 42 d
AP100	40.18 ^a	91.60 ^a	142.10 ^a	161.55 ^a	206.12 ^a	124.98 ^a
AP90	40.31 ^a	84.73 ^b	127.90 ^b	158.08 ^a	198.13 ^b	120.24 ^b
AP80	37.24 ^b	74.38 ^c	113.70 ^c	148.11 ^b	176.11 ^c	107.79 ^c
AP70	34.49 ^c	63.56 ^d	99.50 ^d	129.60 ^c	154.11 ^d	94.41 ^d
P-valor	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
EEM	0.591	2.561	3.645	3.263	4.725	2.736
Contrastes polinómicos ortogonales						
Lineal	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Cuadrático	0.007	0.270	0.320	0.006	0.0012	<0.0001
R ²	0.764	0.895	0.745	0.604	0.934	0.962

PDCA= Promedio Diario de Consumo de Alimento.

EEM= Error Estándar de la Media.

^{a,b,c,d} Diferente literal en la misma columna indica diferencias estadísticamente significativas, $P < 0.05$ $y = 1.0416 x + 23.319$ (PDCA de 7 a 42 días).**Cuadro 5.** Efecto de la AP sobre la CAM (kg/kg) a diferentes edades.

Alimentación programada	CAM (kg/kg)					
	7d	14d	21d	28d	35d	42d
AP100	0.142	0.844 ^a	1.150 ^a	1.357 ^a	1.446 ^a	1.692 ^a
AP90	0.142	0.845 ^a	1.108 ^a	1.274 ^b	1.435 ^b	1.643 ^b
AP80	0.138	0.784 ^b	1.014 ^b	1.195 ^c	1.341 ^c	1.471 ^c
AP70	0.135	0.771 ^b	0.965 ^b	1.126 ^d	1.290 ^d	1.446 ^d
P-valor	0.131	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
EEM	0.001	0.009	0.019	0.021	0.016	0.030
Contrastes polinómicos ortogonales						
Lineal	0.150	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0007
Cuadrático	0.651	0.576	0.868	0.693	0.159	0.363
R ²	0.142	0.562	0.729	0.852	0.788	0.916

CAM= Conversión Alimenticia ajustada por Mortalidad.

EEM= Error Estándar de la Media.

^{a,b,c,d} Diferente literal en la misma columna indica diferencias estadísticamente significativas, $P < 0.05$ $y = 0.0091 x + 0.7895$ (CAM a los 42 días)

Cuadro 6. Efecto de la AP sobre la CAC (kg/kg) a diferentes edades.

Alimentación programada	CAC (kg/kg)					
	7d	14d	21d	28d	35d	42d
AP100	0.142	0.844 ^a	1.166 ^a	1.391 ^a	1.539 ^a	1.898 ^a
AP90	0.142	0.845 ^a	1.127 ^a	1.286 ^b	1.476 ^a	1.856 ^b
AP80	0.138	0.786 ^b	1.027 ^b	1.204 ^c	1.351 ^c	1.485 ^c
AP70	0.135	0.771 ^b	0.977 ^b	1.135 ^d	1.298 ^d	1.459 ^d
P-valor	0.131	0.0007	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0003
EEM	0.001	0.009	0.019	0.023	0.023	0.056
Contrastes polinómicos ortogonales						
Lineal	0.1507	0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Cuadrático	0.6515	0.5306	0.8074	0.3155	0.8001	0.9097
R ²	0.682	0.994	0.758	0.869	0.849	0.862

CAC= Conversión Alimenticia Comercial.

EEM= Error Estándar de la Media.

^{a,b,c,d} Diferente literal en la misma columna indica diferencias estadísticamente significativas, $P < 0.01$

$y = 0.0169x + 0.2397$ (CAC a los 42 días)

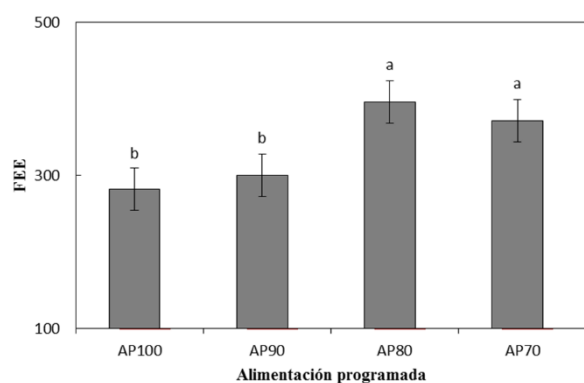


Fig. 7. Efecto de la alimentación programada sobre el Factor de Eficiencia Europeo (FEE)

^{ab} Diferente literal en las barras indican diferencias estadísticamente significativas $P < 0.05$

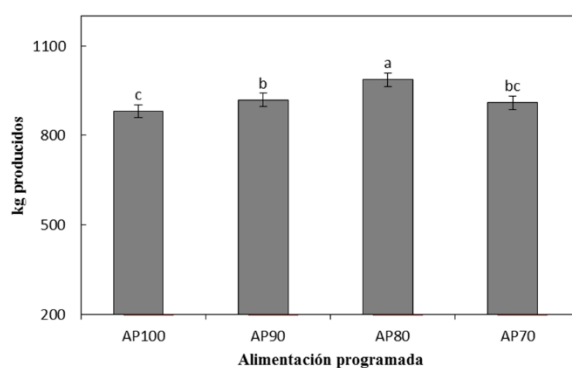


Fig. 8. Efecto de la alimentación programada sobre los kilogramos producidos.

^{abc} Diferente literal en las barras indican diferencias estadísticamente significativas $P < 0.05$

8.3 Relación Ventrículo Derecho : Ambos Ventrículos (VD:AV) y medidas cardiacas.

El peso relativo del corazón, el peso del ventrículo derecho y el peso de ambos ventrículos, así como la relación peso del ventrículo derecho: peso de ambos ventrículos (VD:AV), se presentan en el Cuadro 7. Los pesos del ventrículo derecho en los tratamientos AP100 y AP90 fueron significativamente más pesados que los ventrículos derechos de las aves en los tratamientos AP80 y AP70, presentando al mismo tiempo un efecto lineal ($P=0.0001$). Un efecto similar se puede observar en el peso de ambos ventrículos. Finalmente, en la relación VD:AV se obtuvo una respuesta lineal ($P=0.0039$) lo cual indica que en cuanto más se disminuye el consumo mediante la AP, la relación VD:AV disminuye.

Cuadro 7. Efecto de la AP sobre la relación VD:AV y medidas cardiacas

Alimentación programada	Medidas Cardiacas		
	PVD (g)	PAV (g)	VD:AV
AP100	3.490 ^a	10.978 ^a	0.31 ^a
AP90	3.171 ^a	9.814 ^a	0.32 ^a
AP80	2.680 ^b	9.590 ^b	0.28 ^b
AP70	2.630 ^b	9.110 ^b	0.27 ^b
P-valor	0.0006	0.0036	0.0204
EEM	0.151	0.277	0.010
Contrastes polinómicos ortogonales			
Lineal	0.0001	0.0020	0.0039
Cuadrático	0.2941	0.0162	0.5849
R ²	0.927	0.9001	0.658

VD:AV= Relación Ventrículo Derecho: Ambos Ventrículos.

PVD= Peso del Ventrículo Derecho.

PAV= Peso de Ambos Ventrículos.

EEM= Error Estándar de la Media.

^{ab} Diferente literal en la misma columna indica diferencia significativa $P<0.01$

$y = 0.0013x + 0.1899$ (VD:AV a 42 días)

8.4 Hematocrito (HC), hormonas tiroideas (T3 y T4) y saturación de hemoglobina con oxígeno (saturación HbO₂).

Los resultados de HC y hormonas T3 y T4 se presentan en el Cuadro 8. El HC fue estadísticamente igual en los tratamientos AP100, AP90 y AP80; no obstante, los pollos en el grupo AP70 fueron estadísticamente diferentes a los pollos en los tratamientos AP100 y AP90 ($P=0.0005$) pero igual a las aves del tratamiento AP80. También se observa un efecto lineal ($P=0.0005$) que indica que cuanto más se restringe el consumo, el HC disminuye. No se observaron diferencias en

las hormonas T3 entre el tratamiento AP100 y AP90 ($P>0.05$); no obstante, los tratamientos AP80 y AP70 fueron diferentes entre sí y mayores a los tratamientos AP100 y AP90 ($P<0.05$), también se encontró un efecto lineal significativo (*Lineal*, $P<0.0001$) lo cual indica que conforme se disminuye el consumo de alimento la concentración de la hormona T3 incrementa. Por otra parte, la concentración de la hormona T4 no tuvieron diferencias significativas entre el tratamiento AP100, AP90 ($P>0.05$); sin embargo, fueron diferentes a AP80 y AP70 mismos que compartieron similitudes ($P>0.05$) entre sí. La concentración de la hormona T4 presentó un efecto lineal que indica que cuanto más se restringe el consumo de alimento, la concentración de dicha hormona aumenta (*Lineal*, $P <0.0001$).

Cuadro 8. Efecto de AP sobre el HC y la concentración plasmática de hormonas T3 y T4

Alimentación programada	HC(%)	T3 (ng/ml)	T4 (ng/ml)
AP100	44.40 ^a	1.83 ^c	3.01 ^b
AP90	47.50 ^a	1.73 ^c	2.98 ^b
AP80	42.50 ^{ab}	3.01 ^b	9.63 ^a
AP70	37.40 ^b	3.82 ^a	8.58 ^a
P-valor	0.0005	<0.0001	<0.0001
EEM	1.0373	0.2035	0.7690
Contrastes polinómicos ortogonales			
Lineal	0.0005	<0.0001	<0.0001
Cuadrático	0.0069	<0.0001	0.4538
R ²	0.657	0.8740	0.8420

HC= Hematocrito.

EEM= Error Estándar de la Media.

^{a,b,c} Diferente literal en la misma columna indica diferencias estadísticamente significativas, $P<0.01$

$y = 0.26x + 20.85$ (HC a 42 días),

$y = -0.0725x + 8.76$ (T3 a 42 días)

$y = -0.2336x + 25.906$ (T4 a 42 días)

La saturación de hemoglobina con oxígeno (HbO₂) se vio afectada por la alimentación programada (Fig. 9) ya que los grupos AP80 y AP70 fueron superiores y diferentes estadísticamente a los grupos AP100 y AP90 ($P<0.05$).

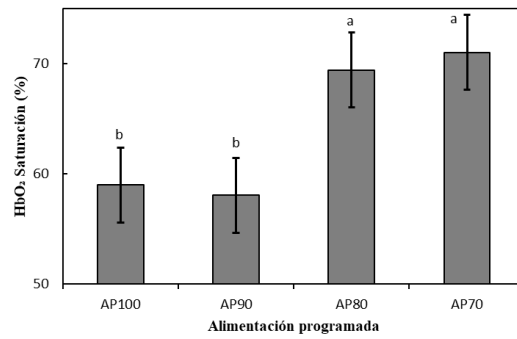


Fig. 9. Efecto de la alimentación programada sobre la saturación de hemoglobina con oxígeno (HbO₂).
^{a,b} Diferente literal en las barras indican diferencias estadísticamente significativas $P < 0.05$

8.5 Indicadores de estrés oxidativo.

8.5.1 Capacidad antioxidante total (FRAP) en tejido pulmonar y cardiaco.

Los efectos de la AP sobre la capacidad antioxidante total del pulmón medida mediante la prueba de FRAP se presentan en la Figura 10. En esta técnica los valores superiores indican menor estrés oxidativo. En la Figura 10 se puede observar que a los 7 y 21 días de edad la AP no tuvo efecto significativo ($P > 0.05$); sin embargo, a los 42 días una disminución estadísticamente significativa ($P < 0.05$) se presentó en el tratamiento AP100, con ello un mayor estrés oxidativo.

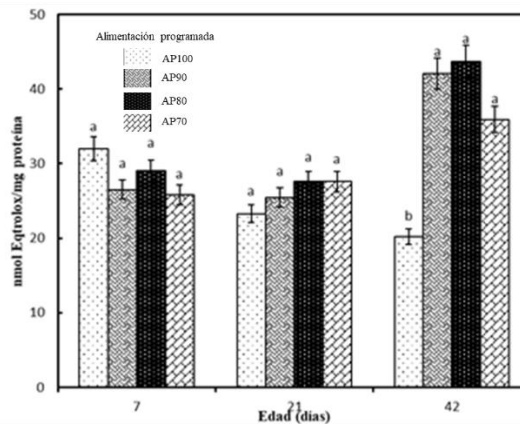


Fig.10. Efecto de la alimentación programada sobre la capacidad antioxidante total (FRAP) en el tejido pulmonar. Diferente literal en las barras indican diferencias estadísticamente significativas, $P < 0.05$

La AP no tuvo efecto sobre la capacidad antioxidante del corazón medida mediante la prueba de FRAP a los 7 y 21 días de edad (Figura 11); sin embargo, a los 42 días el tratamiento con AP100 fue igual a los tratamientos con AP90 y AP80 pero estadísticamente diferente al tratamiento AP70 ($P<0.05$) lo que sugiere que en este órgano el consumo de 70% del alimento respecto al consumo *ad libitum* favoreció el estado antioxidante total.

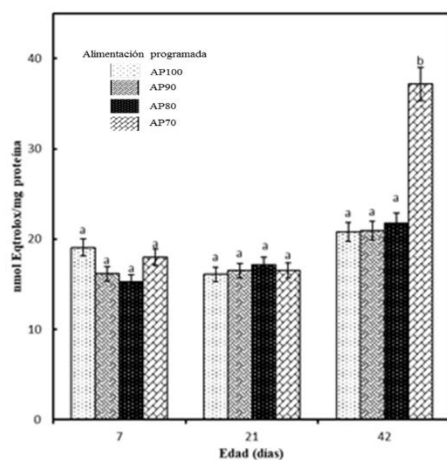


Fig.11. Efecto de la alimentación programada sobre la capacidad antioxidante total (FRAP) en el tejido cardiaco. Diferente literal en las barras indican diferencias estadísticamente significativas, $P<0.05$

8.5.2. Lipoperoxidación en el tejido pulmonar y cardiaco.

La concentración de nmol de MDA es directamente proporcional al daño oxidativo, por lo que las concentraciones mayores indican mayor afectación al tejido. A los 21 días de edad, la AP80 y AP70 parecen tener una tendencia de disminuir la lipoperoxidación del tejido pulmonar si se le compara con el tratamiento AP90 y AP100 ($P=0.06$). Al día 42 el efecto benéfico de la AP es más evidente en los tratamientos con AP80 y AP70 al producirse una menor concentración de MDA en comparación con los tratamientos con AP100 y AP90 ($P<0.05$) (Fig. 12).

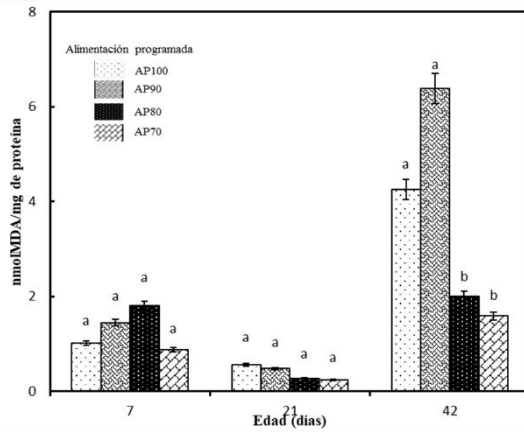


Fig.12. Efecto de la alimentación programada sobre la lipoperoxidación en el tejido pulmonar. Diferente literal en las barras indican diferencias estadísticamente significativas, $P < 0.05$

En la Figura 13 se muestran los efectos de la AP sobre la lipoperoxidación medida mediante la prueba de TBARS en tejido cardiaco. No se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$) en el día 7 ni el día 21 de edad, no obstante, al día 42 el efecto de la AP se manifiesta en los tratamientos con AP80 y AP70 al producirse una menor concentración de MDA en comparación con los tratamientos con AP100 y AP90 ($P < 0.05$).

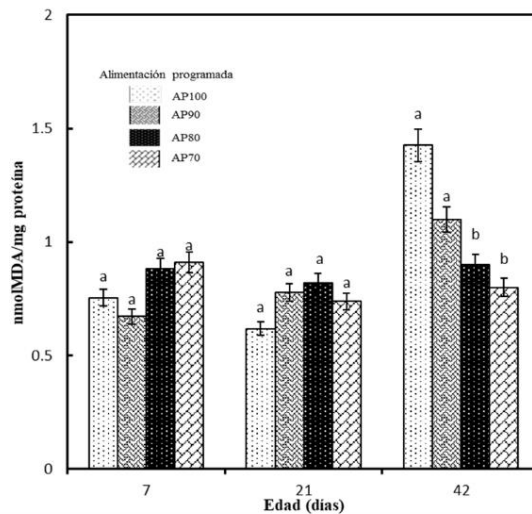


Fig.13. Efecto de la alimentación programada sobre la lipoperoxidación en el tejido cardiaco. Diferente literal en las barras indican diferencias estadísticamente significativas, $P < 0.05$

8.5.3 Actividad de GSH-Px en tejido pulmonar y cardiaco.

El efecto de la AP sobre la actividad de la GSH-Px en tejido pulmonar no fue observado ni en el día 7 de edad ni en el día 21 de edad ($P>0.05$); sin embargo, al día 42 de edad la actividad de GSH-Px del tratamiento AP100 y AP90 fueron estadísticamente inferiores a los tratamientos AP80 y AP70 ($P<0.05$) (Fig.14).

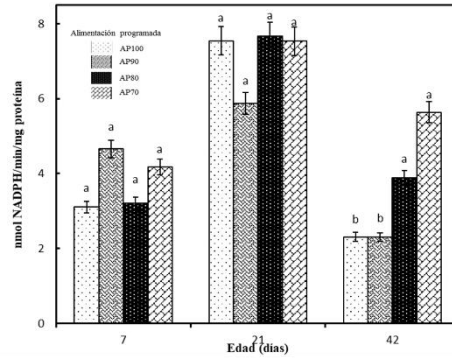


Fig.14. Efecto de la alimentación programada sobre la actividad de glutatión peroxidasa (GSH-Px) en el tejido pulmonar. Diferentes literales en las barras indican diferencias estadísticamente significativas, $P<0.05$

En la Figura 15 se observan los efectos de la AP sobre la actividad de GSH-Px en el tejido cardiaco. No hubo respuesta a los tratamientos durante los 7 y 21 días de edad. No obstante, a los 42 días el tratamiento AP100 y AP90 tuvieron una menor actividad de GSH-Px en comparación con los tratamientos AP80 y AP70 ($P<0.05$).

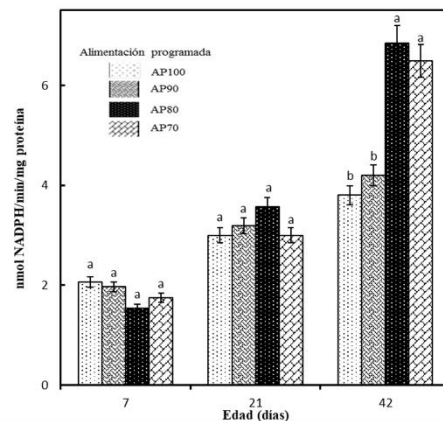


Fig.15. Efecto de la alimentación programada sobre la actividad de glutatión peroxidasa (GSH-Px) en el tejido cardiaco. Diferentes literales en las barras indican diferencias estadísticamente significativas, $P<0.05$

8.5.4 Concentración de ácido ascórbico en tejido pulmonar y cardiaco.

El efecto de la AP sobre la concentración de ácido ascórbico en el tejido pulmonar se muestra en la Figura 16. No hubo efecto de los tratamientos en las dos primeras edades de medición ($P>0.05$). Sin embargo, a los 42 días de edad, se pudo observar una disminución en los tratamientos AP100 y AP90 en comparación con el tratamiento AP80 ($P<0.05$), por otro lado, el tratamiento AP70 no presentó cambios respecto a los tratamientos AP100, AP90 y AP80.

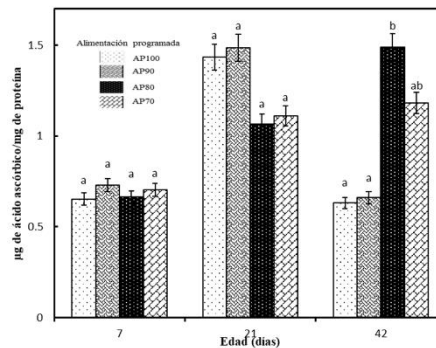


Fig.16. Efecto de la alimentación programada sobre la concentración de ácido ascórbico en el tejido pulmonar. Diferente literal en las barras indican diferencias estadísticamente significativas, $P<0.05$

En la Figura 18 se presentan los efectos inducidos por la AP sobre la concentración de ácido ascórbico en el tejido cardiaco. A los 7 días de edad no se encontraron efectos entre los tratamientos ($P>0.05$). No obstante, a los 21 y 42 días de edad la acción de la AP tuvo efectos sobre los tratamientos AP80 y AP70 al preservar la concentración de ácido ascórbico en el tejido cardiaco de las aves de estos dos tratamientos si se les compara con las aves de los grupos AP100 y AP90 ($P<0.05$).

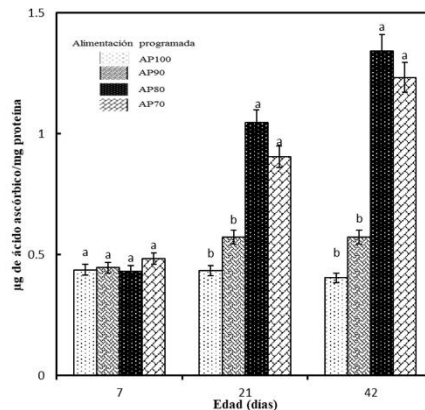


Fig.17. Efecto de la alimentación programada sobre la concentración de ácido ascórbico en el tejido cardiaco. Diferente literal en las barras indican diferencias estadísticamente significativas, $P<0.05$

9. DISCUSIÓN.

9.1 Parámetros productivos.

Varios investigadores han utilizado con éxito la alimentación programada para disminuir la tasa de crecimiento temprano de los pollos de engorda y así reducir la incidencia de SA (Arce-Menocal *et al.*, 1992; Balog *et al.*, 2000 y Özkan *et al.*, 2006). Los resultados de mortalidad por SA en el presente estudio son consistentes con estudios anteriores. Mohammadalipour *et al.* (2017) redujeron la mortalidad en un 85% con una AP del 40% de 7 a 14 días bajo un modelo de baja temperatura para inducir SA. Özkan *et al.* (2010) disminuyeron la mortalidad en un 39% con una AP cualitativa de 7 a 21 días en elevada altitud. Saleh *et al.* (2005) reportan que la mortalidad en pollos con una AP en la que se disminuyó el consumo de alimento de 7 a 14 días, se redujo en un 3.47% respecto a los pollos que fueron alimentados *ad libitum* ($P=0.004$). Khajali *et al.* (2007) informaron una reducción del 67% de la mortalidad por SA con una AP de disminución de consumo de alimento durante la segunda semana de vida en pollos criados a 2100 msnm. En el presente estudio, los tratamientos AP80 y AP70 disminuyeron la mortalidad por SA en un 94.3% y en un 95.8% respectivamente en relación al tratamiento AP100, probablemente al reducir la tasa metabólica en edad temprana de las aves y por lo tanto la demanda de oxígeno en este periodo crucial de la vida de los animales (Arce-Menocal *et al.*, 1992).

El peso a los 42 días de edad se redujo en el tratamiento AP90 en un 5%, en el tratamiento AP80 en un 7% y en el tratamiento AP70 en un 16% respecto al tratamiento AP100, con efecto lineal significativo ($P<0.0001$). Estos datos coinciden con lo reportado por Wijtten *et al.* (2010) quienes al probar un protocolo de AP con 85% de consumo del día 4 al 14 de edad y 95% del día 14 al 21 de edad no consiguieron que las aves bajo la AP alcanzaran el peso de las aves alimentadas *ad libitum*. Igualmente, Özkan *et al.* (2010) señalan que los pollos bajo AP de 7 a 14 días y de 7 a 21 días de edad en condiciones de elevada altitud y termoneutralidad no alcanzan el peso obtenido por las aves alimentadas *ad libitum*. Contrario a estos estudios, Kamely *et al.* (2015) reportan que los pesos de las aves con AP mediante inclusión de cascarilla de arroz a diferentes niveles para diluir el alimento no presentan diferencias significativas en comparación con aves sin inclusión de

cascarilla de arroz ($P=0.202$). En otro estudio, Butzen *et al.* (2013) mostraron que los pollos que recibieron el 80% de la ingesta *ad libitum* entre los 8 y los 16 días de edad no difieren en el peso corporal a los 35 días de edad en comparación con los pollos alimentados a libre acceso. Las diferencias encontradas en la presente investigación y el efecto lineal reportado se deben probablemente a que la cantidad de nutrientes aportados por la ración bajo la AP satisfacen únicamente los requerimientos de mantenimiento de las aves y en menor grado los de producción.

Zhan *et al.* (2007), Butzen *et al.* (2013) y Mohammadalipour *et al.* (2017) suspendieron la AP a temprana edad de las aves teniendo como resultado un consumo de alimento restablecido respecto al grupo control, datos que difieren con los reportados en el presente trabajo ya que el consumo de alimento jamás llegó a igualarse entre los diferentes tratamientos ($P<0.05$) debido al mantenimiento sostenido de la AP durante todo el experimento. La mejora en la CAM en el presente estudio coincide con lo reportado por Saleh *et al.* (2005) quienes usaron un protocolo de AP cuantitativa a temprana edad en la que obtuvieron una CAM de 1.742 en el tratamiento *ad libitum* vs 1.670 en el grupo con AP ($P=0.0001$), éstos datos son importantes ya que pueden estar íntimamente relacionados con la participación de las hormonas tiroideas, lo cual se discutirá más adelante. De igual forma la CAC en los pollos de la AP90, AP80 y AP70 coincide con informes anteriores (Saleh *et al.*, 2005; Özkan *et al.*, 2010; Mohammadalipour *et al.*, 2017). Urdaneta-Rincón y Leeson, (2002) informaron que cuanto más largo es el período de la AP, menor es el índice de conversión acumulada en el día 42 de edad (*Lineal*, $P<0.01$) datos que están de acuerdo con los conseguidos en la presente investigación (*Lineal*, $P<0.0001$). Estos resultados se deben probablemente a la reducción de los requisitos de mantenimiento, lo cual se relaciona con una disminución de la tasa metabólica (Zubair y Leeson, 1994) asociada con un menor peso corporal durante el crecimiento temprano (Urdaneta-Rincón y Leeson, 2002).

Por otra parte, cuando se calcula el FEE el cual contempla en una misma ecuación la viabilidad, la edad de salida del pollo, el PC y la CA; se puede observar que los tratamientos AP80 y AP70 fueron más eficientes productivamente que los tratamientos AP100 y AP90; dicha eficiencia también se puede constatar cuando se calculan los kg de carne producidos, en donde el tratamiento AP80 resultó ser el más productivo pues se puede afirmar que representa un equilibrio entre la

mortalidad y el peso corporal, al contrario de los tratamientos AP100 y AP90 cuya mortalidad elevada disminuye la productividad a pesar de presentar un PC más elevado. Datos que coinciden con los reportados por Martínez *et al.* (1996) quienes mencionan que la AP disminuye la mortalidad por SA e incrementa los kg de pollo producido sugiriendo que esto puede ser rentable para la empresa. Finalmente, una mortalidad baja no significó una elevada producción de carne pues el grupo AP70 tuvo un comportamiento semejante a los grupos AP100 y AP90, resultados que están de acuerdo con los publicados por Salinas *et al.* (2004) quienes no encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando aplicaron una AP de 75% de consumo durante 2 semanas vs un grupo alimentado *ad libitum*.

9.2 Medidas cardíacas.

El corazón responde al aumento de la carga de trabajo con hipertrofia ventricular derecha. Esta hipertrofia se expresa por el aumento en el peso del ventrículo derecho (VD) en relación con el peso de ambos ventrículos (AV), lo que resulta en una relación de peso VD:AV más alta (Sillau *et al.*, 1980). Una relación del VD:AV >0.27 se considera un indicador preciso del inicio del SA (Julian, 1993; Zhou *et al.*, 2008). Los tratamientos con mayor consumo de alimento (AP100 y AP90) exhibieron una relación VD:AV significativamente mayor ($P=0.024$) en comparación con los tratamientos con menor consumo de alimento (AP80 y AP70) lo cual indica que las aves en AP100 y AP90 presentaban SA; sin embargo, las aves del tratamiento AP80 responden a una relación de 0.28 lo cual indica que ya había inicios de SA a los 42 días. Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con los reportados por Pan *et al.* (2005) quienes diseñaron dos modelos de AP; el primero de 60% y 80% de consumo de alimento más un control *ad libitum* y un segundo modelo de 7 a 14 días y de 7 a 21 días de AP más un control de alimentación a libre acceso, consiguiendo con estos modelos una disminución de la relación VD: AV comparado con los grupos controles. Igualmente, Khajali *et al.* (2007) reportan una disminución de la relación VD:AV en el grupo con AP en comparación con el control. Sin embargo, Özkan *et al.* (2010) informan un VD: AV promedio de 0.34 sin diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los grupos con AP cuando las aves son criadas a elevada altura, datos similares fueron reportados por

Özkan *et al.* (2006). No obstante, existe evidencia del efecto directo que pueden tener las ROS sobre la hipertrofia ventricular derecha (Chandel *et al.*, 1998; Waypa *et al.*, 2016), lo cual se discutirá más adelante en la sección de estrés oxidativo.

9.3 Hematocrito y saturación HbO₂.

La hipoxemia generada por la elevada altitud sobre el nivel del mar posiblemente le indica al organismo del ave que produzca eritropoyetina para producir más glóbulos rojos y transportar más oxígeno a los tejidos, lo que resulta en policitemia, ésta, a su vez, aumenta la viscosidad de la sangre lo cual incrementa el hematocrito (Julian, 2007), que oscila de 18 a 30% para pollos normales y de 35 a 60% en pollos con SA (Huchsermeyer, 2011); de acuerdo a estos índices, las aves del presente estudio podrían considerarse todas con SA. Sin embargo, puede tratarse de un mecanismo de compensación para incrementar la capacidad de transporte de oxígeno en la sangre en una atmósfera con baja disponibilidad del mismo. De hecho, las aves y los mamíferos introducidos a gran altitud desarrollan un grado variable de policitemia asociada con un desplazamiento de la curva de disociación de oxígeno hacia la derecha debido a una mayor concentración de 2,3-difosfoglicerato (Monge y León-Velarde, 1991), esta respuesta resulta principalmente de la estimulación de las células precursoras eritroides en la médula ósea por la eritropoyetina producida en el riñón hipóxico (Ostadal y Kolar, 2007). Zhang *et al.* (2007) informaron que los pollos criados a elevada altitud tenían recuentos altos de glóbulos rojos y niveles altos de hemoglobina, ambos como respuestas compensatorias a la baja presión atmosférica de oxígeno. Scheele *et al.* (2003) indican que un HC elevado puede ser indicativo de protección de las aves contra la hipoxemia, entonces el HC alto puede ser un efecto en lugar de un factor predisponente para el SA. Parece, por lo tanto, que el elevado HC resultante en el presente estudio aumentó la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre de los pollos del tratamiento AP80 y AP70 a un nivel suficiente para equilibrar la demanda y el suministro de oxígeno; por lo que el SA no se desarrolló y las aves crecieron normalmente a pesar de los elevados valores de HC.

Durante la progresión fisiopatológica que conduce al SA, los pollos susceptibles exhiben una cianosis leve indicativa de sangre arterial que tiene una baja saturación ($\leq 80\%$) de hemoglobina con oxígeno, esta hipoxemia sirve como un indicador confiable de que los pollos de engorda son pre-SA y posteriormente desarrollarán SA (Wideman *et al.*, 2000b). En las aves de la presente investigación se pudo observar que, pese a la AP, todas las aves presentaron una saturación HbO₂ por debajo del parámetro mencionado, por lo que se puede considerar que todas eran hipoxémicas lo cual puede atribuirse a la altura de 2250 msnm. Sin embargo, las aves con mayor consumo (AP100 y AP90), presentaron un nivel más bajo de saturación HbO₂ ($P < 0.05$) que los tratamientos AP80 y AP70 lo cual puede deberse al aumento de consumo de alimento en los grupos AP100 y AP90 y por lo tanto el incremento de la digestión del mismo y el metabolismo implicado que tiene un alto requerimiento de oxígeno. Cuando aumenta la demanda de oxígeno, incrementa la frecuencia cardíaca y el gasto cardíaco, lo que aumenta el flujo de sangre a través del pulmón y la presión requerida para forzar la sangre a través de las arteriolas y los capilares. El aumento de la velocidad de flujo y el incremento del tiempo de tránsito pueden no permitir que los glóbulos rojos recojan una carga completa de oxígeno para que la saturación de oxígeno de la hemoglobina se complete, lo que aumenta la hipoxemia (Julian, 2007).

9.4 Hormonas tiroideas.

Las hormonas tiroideas, incluidas T3 y T4, se reconocen como hormonas metabólicas clave, que están estrechamente relacionadas con el rendimiento del crecimiento y los cambios en el metabolismo energético de los pollos de engorda, siendo T3 la forma funcionalmente activa (Zhan *et al.*, 2007). Darras *et al.* (1995) reportaron que los pollos a los que se les disminuye el consumo de alimento en un 40% sufren una disminución de la hormona T3 y un incremento de la hormona T4. Li *et al.* (2011) encontraron una depresión de la concentración de la hormona T3 y un incremento de la hormona T4 a los 42 días de edad entre los grupos sometidos a AP vs alimentación *ad libitum* en diferente duración y severidad del programa. En otra investigación, Rezaei y Hajati, (2010) encontraron una depresión de la concentración de T3 y un incremento de T4 en aves expuestas a una AP que consistía en diluir la dieta con 0, 20 y 40% de cascarilla de arroz durante

21 días, las diferencias desaparecieron con la eliminación del programa. La causa principal de la disminución de la circulación de T3 es porque incrementa la degradación de T3 por D3 IRD, sin cambios en la conversión de T4 a T3 por D1 (Darras *et al.*, 1995). Contrario a los trabajos anteriores y bajo las condiciones del presente experimento, se encontró un aumento de T3 y T4 en los tratamientos AP80 y AP70 en comparación con los tratamientos AP100 y AP90 (3.01 y 3.82 vs 1.83 y 1.73, respectivamente). Es probable y dándole una perspectiva distinta a los datos, que no hubo un aumento de las hormonas T3 y T4 en los grupos AP80 y AP70, más bien existió una depresión de las hormonas en los tratamientos AP100 y AP90 cuya disminución en éstas aves con clara evidencia de SA (VD:AV >0.30) podría deberse al estrés hipoxémico, respuesta dada a través de la asociación antagonica de la corticosterona y las hormonas tiroideas (Luger *et al.*, 2002), o bien, ser una característica de la aclimatación celular intentando disminuir la tasa metabólica en un entorno donde la viabilidad del oxígeno es el principal factor limitante debido a la altitud de 2250 msnm y a los altos consumos de alimento y que a su vez, mediante la aplicación de la AP, cuyo resultado es la restricción del crecimiento, produce un desarrollo armonioso de las glándulas tiroides y por lo tanto mejora las funciones de las mismas, lo cual puede traducirse en una adecuada liberación de las hormonas T3 y T4 que a su vez aumentan el 2-3 difosfoglicerato en los eritrocitos, lo que facilita la entrega de oxígeno en los tejidos al desplazar la curva de disociación de la oxihemoglobina hacia la derecha (Swenson y Bärtsch, 2014) con lo cual, probablemente, se genera un mejor aprovechamiento de la energía y por lo tanto de la eficiencia productiva con lo que posiblemente se explica la mejora en la CAM en los tratamientos AP80 y AP70 respecto a los tratamientos AP100 y AP90. No obstante, algunos autores no reportan diferencias estadísticamente significativas entre la AP y los programas *ad libitum*. Mohammadalipour *et al.* (2017) no reportaron diferencias estadísticamente significativas entre un grupo con 40% de disminución de consumo vs un grupo con alimentación a libre acceso (4.22 vs 4.05 respectivamente, $P>0.05$). Akbarian *et al.* (2014) no encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando establecieron un protocolo de AP del 80% de consumo vs alimentación *ad libitum* durante una semana ($P>0.05$). Del mismo modo, Özkan *et al.* (2006) tampoco encontraron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones plasmáticas de T3 entre el grupo bajo AP y el grupo control durante una semana de disminución del consumo.

9.5 Estrés oxidativo.

La exposición a condiciones de hipoxia hipobárica y por lo tanto a estrés oxidativo, quedó manifestada por un incremento en la producción de MDA a los 42 días de edad en el tejido pulmonar y cardiaco de los tratamientos con mayor consumo de alimento (AP100 y AP90), en comparación con los tratamientos AP80 y AP70 ($P < 0.05$). Estos resultados están de acuerdo con los reportados por Pan *et al.* (2005) quienes desarrollaron una AP de 60% y 80% contra un grupo control que era alimentado a libre acceso, con lo cual obtuvieron una disminución de las concentraciones de MDA en los tejidos a los 42 días de edad. La alimentación programada tiende a reducir el peso corporal de las aves y consecuentemente reduce la tasa metabólica y el requerimiento de oxígeno, lo anterior disminuye la generación de ROS y por lo tanto la lipoperoxidación. Por su parte, Nain *et al.* (2008a) informaron que los pollos de engorda comerciales de rápido crecimiento, tienen un alto riesgo de desarrollar insuficiencia cardiaca junto con un mayor estrés oxidativo como resultado de la hipoxia continua; en su investigación, el estrés oxidativo causó daños a los tejidos y agotó el suministro de antioxidantes de los pollos de engorda. En el presente estudio, los animales expuestos a 2250 msnm y elevado consumo de alimento (tratamiento AP100) presentaron un agotamiento mayor de la capacidad antioxidante total medida mediante la prueba de FRAP en el tejido pulmonar a la edad de 42 días ($P < 0.05$), en comparación con los tratamientos AP90, AP80 y AP70, con lo cual se puede suponer que la AP atenúa el efecto de la hipoxia sobre el tejido pulmonar y por lo tanto sobre la producción de estrés oxidativo. No obstante, en el tejido cardiaco, la capacidad antioxidante total se encontró disminuida en los tratamientos AP100, AP90 y AP80 si se les compara con el tratamiento AP70. El corazón es uno de los órganos que más consume energía, lo que requiere un suministro constante de oxígeno para mantener sus funciones metabólicas (Giordano, 2005). En el tejido cardiaco, las mitocondrias comprenden el 30% del volumen del cardiomiocito (Sheeran y Pepe, 2006), los principales sitios de ROS están en el complejo I y III de la cadena transportadora de electrones ubicada en la membrana interna de las mitocondrias. Durante el metabolismo normal entre 1 y 2% del oxígeno se convierte en ROS (Incalza *et al.*, 2018). Por lo tanto, el tejido cardiaco de las aves de los tratamientos AP100, AP90 y AP80 se encontraban bajo un mayor estrés oxidativo y las

disminuciones de consumo de alimento no fueron suficientes para equilibrar el sistema antioxidante, contrario a lo que sucedió en el tejido pulmonar. Cabe mencionar que el efecto producido por el estrés oxidativo sobre el tejido cardiaco puede estar íntimamente asociado con el incremento de la relación VD:AV en los tratamientos AP100, AP90 y AP80 mismos que se encontraban por encima del índice convencional (>0.27), el cual puede ser producto de la hipertensión pulmonar, debida a la sobrecarga del ventrículo derecho, ocurrida durante la exposición a la elevada altitud (2250 msnm). Sin embargo, algunas investigaciones han establecido nuevas vías para el desarrollo de la hipertrofia cardíaca que destacan el estrés oxidativo como el mediador principal. Para apoyar la participación del estrés oxidativo, se realizó un estudio que evaluó tanto las células del músculo liso como las células endoteliales en el desarrollo de la remodelación de la arteria pulmonar bajo hipoxia crónica. En este estudio se encontró que dicha remodelación arterial se produce a través de un factor mitocondrial que requiere a la Proteína Rieske-hierro-azufre (RISP, por sus siglas en inglés), una proteína del complejo mitocondrial III necesaria para la generación de ROS. El agotamiento de RISP en las células endoteliales y las células del músculo liso previno la hipertensión pulmonar inducida por hipoxia crónica, pero no evitó la hipertrofia del ventrículo derecho, lo que sugiere que la remodelación del ventrículo derecho en hipoxia crónica ocurre a través de un mecanismo independiente del aumento de la presión de la arteria pulmonar (Waypa *et al.*, 2016). Por lo tanto, la hipertrofia ventricular derecha podría ser producida directamente por las ROS inducidas por hipoxia.

Surai, (2006) indicó que GSH-Px se asocia con una mayor protección contra el estrés oxidativo originado por diversas manipulaciones ambientales o nutricionales. En efecto, GSH-Px es una enzima bien regulada y su mayor actividad puede considerarse como un importante mecanismo de protección en condiciones de estrés (Surai *et al.*, 2018). La actividad de GSH-Px en el pulmón está íntimamente relacionada con la protección de las células de éste tejido contra la exposición al oxígeno y a los contaminantes oxidantes del aire (Tappel *et al.*, 1982). Iqbal *et al.* (2002) encontraron una mayor actividad de la GSH-Px en mitocondrias de células pulmonares de pollos que presentaban SA en relación con un control. No obstante, la actividad de GSH-Px en el tejido pulmonar de las aves de 42 días de edad del presente estudio fue menor en los tratamientos AP100

y AP90 que tuvieron mayor predisposición de presentar SA debido al elevado consumo de alimento y a la altura de 2250 msnm. Del mismo modo, la actividad de GSH-Px en el tejido cardiaco fue menor en las aves de los tratamientos AP100 y AP90 en comparación con las aves de los grupos AP80 y AP70. Datos que coinciden con los generados por Pan *et al.* (2005) quienes reportan que la actividad de GSH-Px aumenta cuando se realiza una alimentación programada del 80% y el 60%, además encontraron una correlación negativa entre la actividad de GSH-Px y la remodelación vascular pulmonar que está asociado con el aumento del estrés oxidativo. Cabe destacar que las meras condiciones de hipoxia hipobárica impuestas por la altitud de 2250 msnm causaron estragos en la actividad de GSH-Px. Tappel *et al.* (1982) en su investigación exhaustiva sobre la actividad de GSH-Px en tejidos de diferentes especies animales informaron que dicha actividad es de 27 nmolNADPH/min/mg de proteína en el tejido cardiaco y de 10 nmolNADPH/min/mg de proteína en el tejido pulmonar de pollos. En la presente investigación se observó que la actividad de GSH-Px se encontraba mermada por el simple efecto de la altitud de 2250 msnm ya que la actividad de GSH-Px en el tejido cardiaco del grupo con menor estrés oxidativo (AP70) fue de 6.49 nmolNADPH/min/mg de proteína y el de mayor estrés oxidativo (AP100) fue de 3.80 nmolNADPH/min/mg de proteína. En el caso del pulmón, la actividad de GSH-Px en el tratamiento con menor estrés oxidativo (AP70) fue de 5.64 nmolNADPH/min/mg de proteína, mientras que la actividad de GSH-Px en el grupo con mayor estrés oxidativo (AP100) presentaba 2.31 nmolNADPH/min/mg de proteína. Lo cual sugiere que, a pesar del estrés oxidativo en el que se encuentran las aves debido a la hipoxemia generada por la hipoxia hipobárica, la alimentación programada mejoró la actividad antioxidante enzimática de las aves donde fue aplicada pues se sabe que GSH-Px juega un papel crucial en la inhibición del proceso de lipoperoxidación y, por lo tanto, protege a las células del estrés oxidativo (Ighodoro y Akinloye, 2018).

La primera línea de defensa de los pollos contra las ROS es el ácido ascórbico. Las aves son capaces de sintetizarlo, principalmente en los riñones (Leeson y Summers, 2001), debido a que poseen la enzima L-gulonolactona oxidasa para poder hacerlo (Gan *et al.*, 2018). Su suplementación regularmente no se practica; sin embargo, existen algunas situaciones en las que la capacidad de sintetizarlo se ve superada (p.e estrés) (Whitehead y Keller, 2002). En el

experimento presentado aquí, se pudo constatar que las aves mayormente expuestas a SA generada por la altitud de 2250 msnm y los altos consumos de alimento (grupos AP100 y AP90), presentaron una menor concentración de ácido ascórbico en el tejido pulmonar en comparación con los grupos AP80 y AP70 ($P < 0.05$). En el tejido cardiaco se observó el mismo efecto, pero desde el día 21 de edad; al día 42, las reservas de ácido ascórbico de las aves de los grupos AP100 y AP90 se encontraban abatidas si se les compara con las concentraciones de los grupos de menor consumo de alimento (AP80 y AP70). Enkvetchakul *et al.* (1993) demostraron que los niveles de ácido ascórbico en los pulmones de pollos de engorda con SA alojados en un entorno con poca ventilación durante 7 semanas eran bajos. Como ya se ha tratado anteriormente, las aves de los grupos AP100 y AP90 presentaban una marcada signología de SA, por lo que no es sorprendente que las concentraciones de ácido ascórbico fueran bajas en estos animales ya que la actividad del ácido ascórbico como antioxidante en un entorno estresante, es ardua. El ácido ascórbico puede actuar como antioxidante por dos mecanismos: en primer lugar, puede reaccionar con radicales libres acuosos como el hidroxilo y radicales peroxilo donando un electrón para apagar su reactividad. Los radicales libres de ascorbilo, que son menos reactivos, pueden ser reducidos a ácido ascórbico o bien oxidado para formar ácido deshidroascórbico (Whitehead y Keller, 2002). En segundo lugar, el ácido ascórbico es capaz de donar un electrón al radical tocoferil regenerando así al tocoferol (Smirnoff, 2018).

Desafortunadamente, no existe literatura disponible acerca de los efectos de la AP sobre los niveles de ácido ascórbico en tejidos de aves con SA. Sin embargo, el efecto del ácido ascórbico sobre los radicales libres producidos en aves que presentan o son susceptibles a SA está bien respaldado por los estudios donde se ha realizado su suplementación. Nain *et al.* (2008b) administraron 400 mg de Vitamina C/ kg de alimento en aves sometidas a bajas temperaturas para inducirles SA. En su estudio, concluyeron que existe un efecto beneficioso en la suplementación con Vitamina C gracias a sus propiedades antioxidantes o debido a sus funciones como cofactor de otras reacciones enzimáticas pues las aves suplementadas y expuestas a SA tuvieron los mismos niveles de MDA que el grupo control no expuesto. En otro estudio, Qiu-Feng *et al.* (2016) midieron el efecto de administrar 1000 mg de Vitamina C/kg de alimento sobre la remodelación vascular

pulmonar y la expresión relativa del HIF-1 α en pollos bajo un modelo de estrés por frío para inducir SA. Los autores reportan que la Vitamina C redujo la expresión de los genes de HIF-1 α y también afectó positivamente la remodelación vascular pulmonar al aliviar el estrés oxidativo de las aves. Finalmente, Yang *et al.* (2014) reportaron que las aves bajo condiciones de estrés por frío y suplementadas con 1000 mg de vitamina C/kg de alimento incrementan su capacidad antioxidante total medida en el suero sanguíneo en comparación con las aves que no recibieron suplementación.

En conclusión, la alimentación programada al 80% y 70% beneficia a las aves que son criadas a elevada altitud debido a que reduce la tasa de mortalidad por SA, mejora la conversión alimenticia y la producción de kg de carne (esto último en el tratamiento al 80%); fisiológicamente, logra un mantenimiento de la homeostasis de la glándula tiroides en un entorno con baja disponibilidad de oxígeno lo que se traduce en un mejoramiento de la CAM de los tratamientos AP80 y AP70 respecto a AP100 y AP90. Finalmente, esta investigación muestra evidencia de que el protocolo de la AP al 80% y 70% aquí presentado es eficiente para atenuar las condiciones de estrés oxidativo en el tejido cardiaco y pulmonar de aves criadas a elevada altitud (2250 msnm), lo cual se relaciona con la disminución del SA, obteniendo parámetros productivos competitivos ante los programas de alimentación *ad libitum*.

10. LITERATURA CONSULTADA.

Abreu, I.A y Cabelli, D.E. (2010). "Superoxide dismutases a review of the metal associated mechanistic variations". *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804, pp. 263-274.

Acar, N., Sizemore, F. G., Leach, R., Wideman, R. F., Owen, R. L. y Barbato, G. F. (1995). "Growth of broiler chickens in response to feed restriction regimens to reduce ascites". *Poultry Science*, 74, pp. 833-843.

Akbarian, A., Kazerani, H.R., Mohri, M., Raji, A.R., Jamshidi, A. y Golian, A. (2014). "Exogenous melatonin improves growth performance, intestinal microbiota, and morphology in temporarily feed restricted broilers". *Livestock Science*, 167, pp. 400-407.

Al-Ghoulh, I., Khoo, N.K.H., Knaus, U.G., Griendling, K.K., Touyz, R.M., Thannickal, V.J., Barchowsky, A., Nauseef, W.M., Kelley, E.E., Bauer, P. M., Usmar, V.D., Shiva, S., Cifuentes-Pagano, E., Freeman, B.A., Gladwin, M.K. y Pagano, P.J. (2011). "Oxidases and peroxidases in cardiovascular and lung disease: New concepts in reactive oxygen species signaling". *Free Radicals Biology and Medicine*, 51, pp. 1271-1288.

Albers, G., Barranon, Z. y Ortiz. (1990). "Correct feed restriction prevents ascites". *Poultry (Misset)*, April / May, pp. 22-23.

Aragonés, J., Schneider, M., Van Geyte, K., Fraisl, P., Dresselaers, T., Mazzone, M., Dirx, R., Zacchigna, S., Lemieux, H., Jeoung, N.H., Lambrechts, D., Bishop, T., Lafuste, P., Diez-Juan, A., Harten, S.K., Van Noten, P., De Bock, K., Willam, C., Tjwa, M., Grosfeld, A., Navet, R., Moons, L., Vandendriessche, T., Deroose, C., Wijeyekoon, B., Nuyts, J., Jordan, B., Silasi-Mansat, R., Lupu, F., Dewerchin, M., Pugh, C., Salmon, P., Mortelmans, L., Gallez, B., Gorus, F., Buyse, J., Sluse, F., Harris, RA., Gnaiger, E., Hespel, P., Van Hecke, P., Schuit, F., Van Veldhoven, P., Ratcliffe, P., Baes, M., Maxwell, P. y Carmeliet, P. (2008). "Deficiency or inhibition of oxygen sensor Phd1 induces hypoxia tolerance by reprogramming basal metabolism". *Nature Genetics*, 40, pp. 170-180.

Arab, H.A., Jamshidi, R., Rassouli, A., Shams, G. y Hassanzadeh, M. (2006). "Generation of hydroxyl radicals during ascites experimentally induced in broilers". *British Poultry Science*, 47, (2), pp. 216-222.

Arce-Menocal, J., Berger, M. y López, C.C. (1992). "Control of ascites syndrome by feed restriction techniques". *Journal of Applied Poultry Research*, 1, pp. 1-5.

Aviagen. (2014). "Manual de objetivos de rendimiento broiler 308". Aviagen, USA, pp. 1-14.

Bache, R.J. y Chen Y. (2014). "NOX2-induced myocardial fibrosis and diastolic dysfunction: Role of the endothelium", *Journal of the American College of Cardiology*, 63, pp. 2742-2744.

Baghbanzadeh, A. y Decuypere E. (2008). "Ascites syndrome in broilers: physiological and nutritional perspectives". *Avian Pathology*, 37, pp. 117-126.

Balog, J.M., Anthony, N.B., Cooper, M.A., Kidd, B.D., Huff, G.R., Huff, W.E. y Rath, N.C. (2000). "Ascites syndrome and related pathologies in feed restricted broilers raised in a hypobaric chamber". *Poultry Science*, 79, pp. 318-323.

Balog, J.M. (2003). "Ascites syndrome (Pulmonary Hypertension Syndrome) in broiler chickens: Are we seeing the light at the end of the tunnel?" *Avian and Poultry Biology Reviews*, 14, pp. 99-126.

Balsera, M. y Buchanan, B.B. (2019). "Evolution of the thioredoxin system as a step enabling adaptation to oxidative stress". *Free Radical Biology and Medicine*, 140, pp. 28-35.

Barman, S.A., Chen, F., Su, Y., Dimitropoulou, C., Wang, Y., Catravas, J.D., Han, W., Orfi, L., Szantai-Kis, C., Keri, G., Szabadkai, I., Barabutis, N., Rafikova, O., Rafikov, R., Black, S.M., Jonigk, D., Giannis, A., Asmis, R., Stepp, D.W., Ramesh, G. y Fulton, D.J. (2014). "NADPH oxidase 4 is expressed in pulmonary artery adventitia and contributes to hypertensive vascular remodeling". *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34, pp. 1704-1715.

Bautista-Ortega, J., Cortés-Cuevas, A., Ellis, E.A. y Ruiz-Feria, C.A. (2014). “Supplemental L-arginine and vitamins E and C preserve xanthine oxidase activity in the lung of broiler chickens grown under hypobaric hypoxia”. *Poultry Science*, 93, pp. 979-988.

Bautista-Ortega, J. y Ruiz-Feria, C.A. (2010). “L-Arginine and antioxidant vitamins E and C improve the cardiovascular performance of broiler chickens grown under chronic hypobaric hypoxia”. *Poultry Science*, 89, pp. 2141-2146.

Benzie, I. y Strain, J. (1996). “The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of Antioxidant Power: The FRAP Assay”. *Analytical Biochemistry*, 239, pp. 70-76.

Beker, A., VanHooser, S. L., Swartzlander, J. H. y Teeter, R. G. (2003). “Graded atmospheric oxygen level effects on performance and ascites incidence in broilers”. *Poultry Science*, 82, pp.1550-1553.

Bergeron M., Yu, A. Y., Solway, K.E., Semenza, G.L., Sharp, F.R. (1999). “Induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes following focal ischaemia in rat brain”. *European Journal of Neuroscience*, 11, pp. 4159-4170.

Bianco, A.C., Salvatore, D., Gereben, B., Berry, M.J. y Larsen, P.R. (2002). “Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases”. *Endocrinology Review*, 23, pp. 38-89.

Bielski, B.H.J. y Cabelli, D.E. (1995). “Superoxide and hydroxyl radical chemistry in aqueous solution”. En: *Active Oxygen in Chemistry*, Foote CS, Valentine JS, Greenberg A, Liebman JF (Eds). Chapman and Hall, London, pp. 66-104.

Bielski, B.H.J., Cabelli, B.H., Arudi, R.L. y Ross, A.B. (1985). “Reactivity of RO₂/O₂. radicals in aqueous solution”. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 14, pp. 1041-1100.

Bottje, W., Enkvetchakul, B. y Wideman, R. (1995). “Antioxidants, hypoxia and lipid peroxidation involvement in pulmonary hypertension syndrome (ascites)”. *Novus Nutr Update*, 5 (2), pp. 1-11.

Bottje, W.G., Erf, G.F., Bersi, T.K., Wang, S., Barnes, D. y Beers, K.W. (1997). “Effect of dietary DL- α -tocopherol on tissue α - and γ -tocopherol and pulmonary hypertension syndrome (ascites) in broilers. *Poultry Science*, 76, pp. 1506-1512.

Bouvet, J., Usson, Y. y Legrand, J. (1987). “Morphometric analysis of the cerebellar Purkinje cell in the developing normal and hypothyroid chick”. *International Journal. Developmental Neuroscience*, 5, pp. 345-355. En: *Sturkie’s avian physiology sixth edition. Capítulo 24*, McNabb y Darras (Eds). Elsevier, Academic Press: NY, 2015, pp. 535-547.

Bradford, M.M. (1976). “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”. *Analytical Biochemistry*, 72, pp. 248-254.

Brigelius-Flohé, R. y Maiorino, M. (2013). “Glutathione peroxidases”. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830, pp. 3289-3303.

Butzen, F.M., Ribeiro, A.M.L., Vieira, M.M., Kessler, A.M., Dadalt, J.C. y Della, M.P. (2013). “Early feed restriction in broilers. I—Performance, body fraction weights, and meat quality”. *Journal Applied Poultry Research*, 22, pp. 251-259.

Bunk, M.J. y Combs, G.F. (1980). “Effect of selenium on appetite in the selenium-deficient chick. *Journal of Nutrition*, 110, pp. 743-749.

Buys, N., Bartha, T., Buyse, J., Albers, G.A.A. y Decuypere, E. (1993). “Effect of dietary T3 supplementation on ascites incidence in an ascites-sensitive and -resistant broiler line: influence on liver deiodination activity and on hormonal profiles in plasma, pericardial and abdominal ascitic fluid”. *Proceedings of the 9th Symposium on Poultry Nutrition*, Jelenia Góra, Poland, pp. 462-467.

Buys, N., Buyse, J., Hassanzadeh, M. y Decuypere, E. (1998). "Intermittent lighting reduces the incidence of ascites in broilers: an interaction with protein content of feed on performance and the endocrine system". *Poultry Science*, 77, pp. 54-61.

Buys, N., Scheele, C.W., Kwakernaak, C., van der Klis, J.D. y Decuypere, E. (1999). "Performance and physiological variables in broiler chickens lines differing in susceptibility to the ascites syndrome: 1. Changes in blood gases as a function of ambient temperatura". *British Poultry Science*, 40, pp. 135-139.

Buyse, J., Decuypere, E. y Michels, H. (1994). "Intermittent lighting and broiler production. 1. Effect on female broiler performance". *Archiv für Geflügelkunde*, 58, pp. 69-74.

Buyse, J., Simons, P.C.M., Boshouwers, F.M.G. y Decuypere, E. (1996). "Effect of intermittent lighting, light intensity and light source on the performance and welfare of broilers". *World's Poultry Science Journal*, 52, pp. 121-130.

Camacho-Fernandez, D., Lopez, C., Ávila, E. y Arce, J. (2002). "Evaluation of different dietary treatments to reduce the ascites syndrome and their effect on corporal characteristics in broiler chickens". *The Journal of Applied Poultry Research*, 11, pp. 164-174.

Chelikani, P., Fita, I. y Loewen, P.C. (2004). "Diversity of structures and properties among Catalases". *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61, pp. 192-208.

Chen, F., Haigh, S., Barman, S. y Fulton, D.J. (2012). "From form to function: The role of Nox4 in the cardiovascular system". *Frontiers in Physiology*, 412, pp. 1-12.

Christen, S., Woodall, A. A, Shigenaga, M. K., Southwell-Keely, P.T., Duncan, M. W. y Ames, B. N. (1997). "Gamma-Tocopherol traps mutagenic electrophiles such as NO(X) and complements alpha-tocopherol: physiological implications". *Proceedures of National Academic Science USA*, 94, pp. 3217-3222.

Classen, H.L., Riddell, C. y Robinson, F.E. (1991). "Effect of increasing photoperiod length on performance and health of broiler chickens". *British Poultry Science*, 32, pp. 21-29.

Closter, A.M., van As, P., Elferink, M. G., Crooijmanns, R. P. M. A., Groenen, M. A. M., Vereijken, A. L. J., Van Arendonk, J. A. M. y Bovenhuis, H. (2012). "Genetic correlation between heart ratio and body weight as a function of ascites frequency in broilers split up into sex and health status". *Poultry Science*, 91, pp. 556-564.

Cogburn, L.A. y Freeman, R.M. (1987). "Response surface of daily thyroid hormone rhythms in young chickens exposed to constant ambient temperature". *General Comparative Endocrinology*, 68, pp. 113-123. En: *Sturkie's avian physiology sixth edition*. Capítulo 24, McNabb y Darras (Eds). Elsevier, Academic Press: NY, 2015, pp. 535-547.

Cooney, R.V., Franke, A.A., Harwood, P.J., Hatch-Pigott, V., Custer, L.J. y Mordan, L.J. (1993). "γ-Tocopherol detoxification of nitrogen dioxide: superiority to α-tocopherol". *Proceedure of National Academic Science USA*, 90, pp. 1771-1775.

Cooney, R.V., Harwood, P.J., Franke, A.A., Narala, K., Sundström, A. K., Berggren, P.O. y Mordan, L. J. (1995). "Products of γ-tocopherol reaction with NO₂ and their formation in rat insulinoma (RINm5F) cells". *Free Radical Biology and Medicine*, 19, pp. 259-269.

Crespo, R. y Shivaprasad, H.L. (2003). "Diseases of Poultry", 11th edition. Ames: Iowa State Press. Pp. 1072-1075.

Danforth Jr., E. y Burger, A. (1984). "The role of thyroid hormones in the control of energy expenditure". *Clinical Endocrinology and Metabolism*, 13, pp. 581-595. En: *Sturkie's avian physiology sixth edition*. Capítulo 24, McNabb y Darras (Eds). Elsevier, Academic Press: NY, 2015, pp. 535-547.

Darras, V.M., Cokelaere, M., Dewil, E., Arnouts, S., Decuypere, E. y Khün, E.R. (1995). "Partial food restriction increases hepatic inner ring deiodinating activity in the chicken and the rat". *General and Comparative Endocrinology*, 100, pp. 334-338.

Darras, V.M., Van Herck, S.L.J., Geysens, S. y Reynolds, G.E. (2009). "Involvement of thyroid hormones in chicken embryonic brain development". *General Comparative Endocrinology*, 163, pp. 58-62.

Darras, V.M., Verhoelst, C.H., Reynolds, G.E., Kühn, E.R. y Van der Geyten, S. (2006). "Thyroid hormone deiodination in birds". *Thyroid*, 16, pp. 25-35.

Darras, V.M., Visser, T.J., Berghman, L.R. y Kühn, E.R. (1992). "Ontogeny of type I and type II deiodinase activities in embryonic and posthatch chicks: relationship with changes in plasma triiodothyronine and growth hormone levels". *Comparative Biochemistry Physiology A*, 103, pp. 131-136.

De Groef, B., Van der Geyten, S., Darras, V.M. y Kühn, E.R. (2006). "Role of corticotropin-releasing hormone as a thyrotropin-releasing factor in non-mammalian vertebrates". *General Comparative Endocrinology*, 146, pp. 62-68.

Debonne, M., Baarendse, P.J.J., Van Den Brand, H., Kemp, B., Bruggeman, V. y Decuyper, E. (2008). "Involvement of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis and its interaction with the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the ontogeny of avian thermoregulation: a review". *World's Poultry Science Journal*, 64, pp. 309-321.

Decuyper, E. y Kühn, E.R. (1988). "Thyroid hormone physiology in galliformes: age and strain related changes in physiological control". *American Zoology*, 28, pp. 401-415. En: *Sturkie's avian physiology sixth edition*. Capítulo 24, McNabb y Darras (Eds). Elsevier, Academic Press: NY, 2015, pp. 535-547.

Decuyper, E., Buyse, J. y Buys, N. (2000). "Ascites in broiler chickens: exogenous and endogenous structural and functional causal factors". *World's Poultry Science Journal*, 56, pp. 367-377.

Decuyper, E., Hassanzadeh, M. y Buys, N. (2005). "Further insights into the susceptibility of broilers to ascites". *The Veterinary Journal*, 169, pp. 319-320.

Decuypere, E., Vega, C., Bartha, T., Buyse, J., Zoons, J. y Albers, G.A.A. (1994). "Increased sensitivity to triiodothyronine (T3) of broiler lines with a high susceptibility for ascites". *British Poultry Science*, 35, pp. 287-297.

Dewil, E., Buys, N., Albers, G.A.A. y Decuypere, E. (1996). "Different characteristics in chick embryos of two broiler lines differing in susceptibility to ascites". *British Poultry Science*, 37, pp.1003-1013.

Díaz-Cruz, A., Nava, C., Villanueva, R., Serret, M., Guinzberg, R. y Piña, E. (1996). "Hepatic and cardiac oxidative stress and other metabolic changes in broilers with the ascites syndrome". *Poultry Science*, 75 (7), pp. 900-903.

Dosek, A., Ohno, H., Acs, Z., Taylor, A.W. y Radak, Z. (2007). "High altitude and oxidative stress". *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 158, pp. 128-131.

Dozier, W.A., Lien, R.J., Hess, J.B., Bilgili, S.F., Gordon, R.W., Laster, C.P. y Vieira, S.L. (2002). "Effects of Early Skip-a-Day Feed Removal on Broiler Live Performance and Carcass Yield". *Journal of Applied Poultry Research*, 11, pp. 297-303.

Druyan, S., Shlosberg, A. y Cahaner, A. (2007). "Evaluation of Growth Rate, Body Weight, Heart Rate, and Blood Parameters as Potential Indicators for Selection Against Susceptibility to the Ascites Syndrome in Young Broilers". *Poultry Science*, 86, pp. 621-629.

Du, J., Cullen, J.J. y Buettner, G.R. (2012). "Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer". *Biochimica et Biophysica Acta*, 1826, pp. 443-457.

Eguchi, H., Ikuta, T., Tachibana, T., Yoneda, Y. y Kawajiri, K. (1997). "A nuclear localization signal of human aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator/hypoxia-inducible factor 1beta is a novel bipartite type recognized by the two components of nuclear pore-targeting complex". *Journal of Biology and Chemistry*, 272, pp. 1764-17647.

Ellestad, L.E., Saliba, J. y Porter, T.E. (2011). "Ontogenic characterization of gene expression in the developing neuroendocrine system of the chick". *General Comparative Endocrinology*, 171, pp. 82-93. En: *Sturkie's avian physiology sixth edition*. Capítulo 24, McNabb y Darras (Eds). Elsevier, Academic Press: NY, 2015, pp. 535-547.

Enkvetchakul, B., Bottje, W., Anthony, N. y Moore, R. (1993). "Compromised antioxidant status associated with ascites in broilers". *Poultry Science*, 72, pp. 2272-2280.

Epstein, A.C., Gleadle, J.M., McNeill, L.A., Hewitson, K.S., O'Rourke, J., Mole, D.R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M.I., Dhanda, A., Tian, Y.M., Masson, N., Hamilton, D.L., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Schofield, C.J. y Ratcliffe, P.J. (2001). "Egans, EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation". *Cell*, 107, pp. 43-54.

Estévez, M. (2015). "Oxidative damage to poultry: from farm to fork". *Poultry Science*, 94, pp. 1368-1378.

Eshratkhah, B., Zadeh, S.A., Forousan, V., Parsa, A.A.P. y Ghalehkandi, J.G. (2011). "Comparative study on the determination of serum thyroid hormones by two methods of immunoassay in broiler breeder poultry". *Comparative Clinical Pathology*, 20, pp. 337-340.

Fedde, M.R. (1998). "Relationship of structure and function of the avian respiratory system to disease susceptibility". *Poultry Science*, 77, pp. 1130-1138.

Fellenberg, M.A y Speisky, H. (2006). "Antioxidants: their effects on broiler oxidative stress and its meat oxidative stability". *World's Poultry Science Journal*, 62, pp. 53-70.

Fischer, A.J., Bongini, R., Bastaki, N. y Sherwood, P. (2011). "The maturation of photoreceptors in the avian retina is stimulated by thyroid hormone". *Neuroscience*, 178, pp. 250-260. En: *Sturkie's avian physiology sixth edition*. Capítulo 24, McNabb y Darras (Eds). Elsevier, Academic Press: NY, 2015, pp. 535-547.

Flamant, F. y Samarut, J. (1998). "Involvement of thyroid hormone and its alpha receptor in avian neurulation". *Development Biology*, 197, pp. 1-11. En: *Sturkie's avian physiology sixth edition*. Capítulo 24, McNabb y Darras (Eds). Elsevier, Academic Press: NY, 2015, pp. 535-547.

Forrest, D., Hallbook, F., Persson, H. y Vennstrom, B. (1991). "Distinct functions for thyroid hormone receptors alpha and beta in brain development indicated by differential expression of receptor genes". *EMBO Journal*, 10, pp. 269-275. En: *Sturkie's avian physiology sixth edition*. Capítulo 24, McNabb y Darras (Eds). Elsevier, Academic Press: NY, 2015, pp. 535-547.

Galton, V.A. y Hiebert, A. (1987). "The ontogeny of the enzyme systems for the 5'- and 5-deiodination of thyroid hormones in chick embryo liver". *Endocrinology*, 120, pp. 2604-2610. En: *Sturkie's avian physiology sixth edition*. Capítulo 24, McNabb y Darras (Eds). Elsevier, Academic Press: NY, 2015, pp. 535-547.

Gallagher, S.A. y Hackett, P.H. (2004). "High altitude illness". *Emergency Medicine Clinics of North America*, 22, pp. 329-355.

Gan, L., Fan, H. y Guo, Y. (2018). "Ascorbic acid synthesis and transportation capacity in old laying hens and the effects of dietary supplementation with ascorbic acid". *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 9 (71), pp. 1-12.

Gastwirth, J.L., Gel, R.Y y Miao, W. (2009). "The impact of Leven's test of equality of variances on statistical theory and practice". *Statistical Science*, 24 (3), pp. 343-360.

Geng, A. L., Guo, Y. M., Yuan, J. M. (2004). "Effects of dietary L-carnitine and coenzyme Q10 supplementation on performance and ascites mortality of broilers". *Archives of Animal Nutrition*, 58, pp. 473-482.

Geysens, S., Ferran, J.L., Van Herck, S.L., Tylzanowski, P., Puellas, L. y Darras, V.M. (2012). "Dynamic mRNA distribution pattern of thyroid hormone transporters and deiodinases during early embryonic chicken brain development". *Neuroscience*, 221, pp. 69-85.

Giordano, F.J. (2005). "Oxygen, oxidative stress, hypoxia and heart failure". *The Journal of Clinical Investigation*, 115, pp. 500-508.

Gonzales, E., Buyse, J., Loddi, M.M., Takita, T.S., Buys, N. y Decuypere, E. (1998). "Performance, incidence of metabolic disturbance and endocrine variables of food-restricted male broiler chickens". *British Poultry Science*, 39, pp. 671-678.

Gutteridge, J.M. (1975). "The Use of Standards for Malonyldialdehyde". *Analytical Biochemistry*, 69, pp. 518-526.

Hall, S.A. y Machicao, N. (1968). "Myocarditis in broiler chickens reared at high altitude". *Avian Diseases*, 12, pp. 75-84.

Halliwell, B. y Gutteridge, J. (2007). "Free Radicals in Biology and Medicine". Cuarta edición. Oxford University Press, New York.

Halliwell, B y Gutteridge, J. (2015). "Free Radicals in Biology and Medicine". Quinta edición. Oxford University Press, New York.

Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. (1990). "Role of free radicals and catalytic metal ion in human disease: an overview". *Methods in Enzymology*, 186, pp. 1-85.

Hancock, J.T., Desikan, R. y Neill, S.J. (2011). "Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways". *Biochemical Society Transactions*, 29, pp. 345-350.

Hassanzadeh, M., Al-Masri, F., Maddadi, M.S., Shojaei, H., Eghbalian, A., Abbasi, S. y Yousefi, K. (2012). "Comparative study on the beneficial effects of different darklength schedules on the incidence of ascites and metabolic parameters in fast growing broiler chickens". *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 6, pp. 113-121.

Hassanzadeh, M., Bozorgmehri, M. H., Buyse, J., Bruggeman, V. y Decuypere, E. (2004). "Effect of chronic hypoxia during embryonic development on physiological functioning and on hatching

and post-hatching parameters related to ascites syndrome in broiler chickens”. *Avian Pathology*, 33, pp. 558-564.

Hassanzadeh, M., Bozorgmeri-Fard, M.H., Akbari, A.R., Buyse, J. y Decuypere E. (2000). “Effect of intermittent lighting schedules during the natural scotoperiod on T3-induced ascites in broiler chickens”. *Avian Pathology*, 29, pp. 433-439.

Hassanzadeh, M., Bozorgmeri-Fard, M.H., Buyse, J. y Decuypere E. (2003). “The beneficial effects of alternative lighting schedules on the incidence of ascites and metabolic parameters of broiler chickens”. *Acta Veterinaria Hungarica*, 51, pp. 513-520.

Hassanzadeh, M., Buys, N., Dewil, E., Rahimi, G. y Decuypere, E. (1997). “The rophylactic effect of vitamin C supplementation on broiler ascites incidence and plasma thyroid hormone concentration”. *Avian Pathology*, 26, pp. 33-44.

Hassanzadeh, M., Buyse, J. y Decuypere, E. (2008). “Further evidence for the involvement of anatomical parameters of cardiopulmonary system in the development of ascites syndrome in broiler chickens”. *Acta Veterinaria Hungarica*, 56, pp. 71-80.

Hassanzadeh, M., Buyse, J., Toloei, T. y Decuypere, E. (2014). “Ascites Syndrome in Broiler Chickens: A Review on the Aspect of Endogenous and Exogenous Factors Interactions”. *Journal of Poultry Science*, 51, pp. 229-241.

Hassanzadeh, M., Gilanpour, H., Charkhkar, S., Buyse, J. y Decuypere E. (2005b). “Anatomical parameters of cardiopulmonary system in three different lines of chickens: further evidence for involvement in ascites syndrome”. *Avian Pathology*, 34, pp. 1-6.

Hassanzadeh, M., Maddadi, M.S., Mirzaie, S., Assasie, K. y Moayyedian, H. (2010). “Partial pressure of carbon dioxide in venous blood of young birds as predicting indicator for ascites susceptibility in broiler chickens”. *Acta Veterinaria Hungarica*, 58, pp. 221-230.

Hassanzadeh, M., Shojadoost, B., Feyzih, A., Buyse, J. y Decuypere E. (2005a). "Effect of intermittent lighting schedules at the young age of broiler chickens on the incidence of ascites and metabolic parameters". *Archiv für Geflügelkunde*, 69, pp. 57-6.

Herrera-Haro, J.P. y García-Artiga, C. (2011). "Biostatística en ciencias veterinarias". Universidad Complutense de Madrid, Madrid España, pp. 251.

Hollander, M., Wolfe, D.A. y Chicken, E. (2014). "Nonparametric statistical methods". John Wiley & Sons, Inc., NJ, pp. 1-809.

Hon, W.C., Wilson, M.I., Harlos, K., Claridge, T.D., Schofield, C.J., Pugh, C.W., Maxwell, P.H., Ratcliffe, P.J., Stuart, D.I. y Jones, E.Y. (2002). "Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by pVHL". *Nature*, 417, pp. 975-978.

Hoving-Bolink, A.H., Kranen, R.W., Klont, R.E., Gerritsen, C.L.M. y de Greef, K.H. (2000). "Fibre area and capillary supply in broiler breast muscle in relation to productivity and ascites". *Meat Science*, 56, pp. 397-402.

Hoyland, D.V. y Taylor. A.J. (1991). "A Review of the Methodology of the 2-Thiobarbituric Acid Test". *Food Chemistry*, 40, pp. 271-291.

Huchsermeyer, F.W. (2011). "Broiler ascites: a review of the ascites work done at the poultry section of the Onderstepoort Veterinary Institute 1981-1990". *World's Poultry Science Journal*, 68, pp. 41-50

Ighodaro, O.M. y Akinloye, O.A. (2018). "First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid". *Alexandria Journal of Medicine*, 54, pp. 287-293.

Ilavazhagan, G., Bansal, A., Prasad, D., Thomas, P., Sharma, S.K., Kain, A.K., Kumar, D. y Selvamurthy, W. (2001). "Effect of vitamin E supplementation on hypoxia-induced oxidative damage in male albino rats". *Aviation Space and Environmental Medicine*, 72, pp. 899-903.

Incalza, M.A., D'Oria, R., Natalicchio, A., Perrini, S., Laviola, L. y Giorgino, F. (2018). "Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases". *Vascular Pharmacology*, 100, pp. 1-19.

Iqbal, M., Cawthon, D., Beers, K., Wideman, R.F. y Bottje, W. G. (2002). "Antioxidant enzyme activities and mitochondrial fatty acids in pulmonary hypertension syndrome (PHS) in broilers". *Poultry Science*, 81, pp. 252-260.

Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S. y Kaelin, W.G Jr. (2001). "HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing". *Science*, 292, pp. 464-468.

Jagota, S.K y Dani, H.M. (1982). "A new colorimetric technique for the estimation of vitamin C folin phenol reagent". *Analytical Biochemistry*, 127, pp. 178-182.

Jiang, Q. (2014). "Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy". *Free Radical Biology and Medicine*, 72, pp. 76-90.

Jiang, Q., Christen, S., Shigenaga, M.K. y Ames, B.N. (2001). "Gamma-Tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention". *American Journal of Clinical Nutrition*, 74, pp. 714-722.

Joanny, P., Steinberg, J., Robach, P., Richalet, J.P., Gortan, C., Gardette, B. y Jammes, Y. (2001). "Operation Everest III (Comex'97): the effect of simulated severe hypobaric hypoxia on lipid peroxidation and antioxidant defence systems in human blood at rest and after maximal exercise". *Resuscitation*, 49, pp. 307-314.

Joubert, R., Métayer Coustard, S., Swennen, Q., Sibut, V., Crochet, S., Cailleau-Audouin, E., Buyse, J., Decuypere, E., Wrutniak-Cabello, C., Cabello, G., Tesseraud, S. y Collin, A. (2010). "The beta-adrenergic system is involved in the regulation of the expression of avian uncoupling

protein in the chicken”. *Domestic Animal Endocrinology*, 38, pp. 115-125. En: *Sturkie’s avian physiology sixth edition*. Capítulo 24, McNabb y Darras (Eds). Elsevier, Academic Press: NY, 2015, pp. 535-547.

Julian, R. J. (2007). “The response of heart and pulmonary arteries to hypoxia, pressure and volume. A short review”. *Poultry Science*, 86, pp. 1006-1011.

Julian, R.J. (1993). “Ascites in poultry”. *Avian Pathology*, 22, pp. 419-454.

Julian, R.J. (2000). “Physiological management and environmental triggers of the ascites syndrome: A review”. *Avian Pathology*, 29, pp. 519-527.

Julian, R.J. y Wilson, J.B. (1986). “Right ventricular failure as a cause of ascites in broiler and roaster chickens”. *Proceedings of the IVth International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnosticians*, Amsterdam, 1986, pp. 608-611.

Kalmar, I.D., Vanrompay, D. y Janssens, G.P.J. (2013). “Broiler ascites syndrome: Collateral damage from efficient feed to meat conversion”. *The Veterinary Journal*, 197, pp. 169-174.

Kamely, M., Torshizi, M.A.K. y Rahimi, S. (2015). “Incidence of ascites syndrome and related hematological response in short-term feed-restricted broilers raised at low ambient temperatura”. *Poultry Science*, 94, pp. 2247-2256.

Kaplowitz, N., Tak-Yee, AW. y Ockhtens, M. (1985). “The regulation of hepatic glutathione”. *Annal Review of Pharmacology and Toxicology*, 25, pp. 715-44.

Katalinic, V., Modun, D., Music, I. y Boban, M. (2005). “Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2V-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays”. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 140, pp. 47-52.

Khajali, F. y Khajali, Z. (2014). “L-carnitine supplementation decreases lipid peroxidation and improves cardiopulmonary function in broiler chickens reared at high altitude”. *Acta Veterinaria Hungrica*, 62, pp. 489-499.

Khajali, F. y Qujeq, D. (2005). “Relationship between growth and serum lactate dehydrogenase activity and the development of ascites in broilers subjected to skip-a-day feed restriction”. *International Journal of Poultry Science*, 4, pp. 317-319.

Khajali, F. y Wideman, R.F. (2016). “Nutritional approaches to ameliorate pulmonary hypertension in broiler chickens”. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 100, pp. 3-14.

Khajali, F., Zamani-Moghaddam, A. y Asadi-Khoshoei, E. (2007). “Application of an early skip-a-day feed restriction on physiological parameters, carcass traits and development of ascites in male broilers reared under regular or cold temperatures at high altitude”. *Animal Science Journal*, 78, pp. 159-163.

Kojima, I., Tanaka, T., Inagi, R., Kato, H., Yamashita, T., Sakiyama, A., Ohneda, O., Takeda, N., Sata, M., Miyata, T., Fujita, T. y Nangaku, M. (2007). “Protective role of hypoxia-inducible factor-2alpha against ischemic damage and oxidative stress in the kidney”. *Journal of American Society of Nephrology*, 18, pp. 1218-1226.

Ladmakhi, M.H., Buys, N., Dewil, E., Rahimi, G. y Decuyper, E. (1997). “The prophylactic effect of vitamin C supplementation on broiler ascites incidence and plasma thyroid hormone concentration”. *Avian Pathology*, 26(1), pp. 33-44.

Lee, S.H., Wolf, P.L., Escudero, R., Deutsch, R., Jamieson, S.W. y Thistlethwaite, P.A. (2000). “Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction”. *The New England Journal of Medicine*, 342, pp. 626-633.

Leeson, S. y Summers, J.D. (2001). “*Scott's Nutrition of the Chicken*”, fourth ed. University Books, Guelph, Ontario, Canada.

Lasségue, B. y Griendling, K. K. (2010). "NADPH oxidases: Functions and pathologies in the Vasculature". *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 30 pp. 653-661.

LI, L., Zhao, G., Zhiyou, R., Lei, D., Zheng, H., Wang, J. y He, Y. (2011). "Effects of early feed restriction programs on production performance and hormone level in plasma of broiler chickens". *Frontiers in Agriculture in China*, 5 (1), pp. 94-101.

López-Coello, C., Arce-Menocal, J., Ávila-González, E. y Vázquez-Pelaez, C. (1991). "Investigaciones sobre el síndrome ascítico en pollos de engorda". *Ciencia Veterinaria*, 5, pp. 13-48.

Lorenzoni, A.G. y Ruiz-Feria, C.A. (2006). "Effects of vitamin E and Arginine on cardiopulmonary function and acites parameters in broiler chickens reared under subnormal temperaturas". *Poultry Science*, 85, pp. 2241-2250.

Lu, S.C. (2009). "Regulation of glutathione synthesis". *Molecular Aspects of Medicine*, 30 (1-2), pp. 42-59.

Lubritz, D., Smith, J. y McPherson, B. (1995). "Heritability of ascites and the ratio of right to total ventricle weight in broiler breeder male lines". *Poultry Science*, 74, pp. 1237-1241.

Luger, D., Shinder, D., Rzepakovsky, V., Rusal, M. y Yahav, S. (2001). "Association between weight gain, blood parameters, and thyroid hormones and the development of ascites syndrome in broiler chickens". *Poultry Science*, 80, pp. 965-971.

Luger, D., Shinder, D. y Yahav, S. (2002). "Hyper- or hypothyroidism: its association with the development of ascites syndrome in fast-growing chickens". *General and Comparative Endocrinology*, 127, pp. 293-299.

Luger, D., Shinder, D., Wolfenson, D. y Yahav, S. (2003). "Erythropoiesis regulation during the development of ascites syndrome in broiler chickens: A possible role of corticosterone on egg production". *Journal of Animal Science*, 81, pp. 784-790.

Lykkesfeldt, J. y Svedsen, O. (2007). "Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals". *The Veterinary Journal*, 173, pp. 502-511.

Maiden, M.J. y Torpy, D.J. (2019). "Thyroid hormones in critical illness". *Critical Care Clinics*, 35 (2), pp. 375-388.

Makino, Y., Kanopka, A., Wilson, W.J., Tanaka, H. y Poellinger, L. (2002). "Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3alpha locus". *Journal Biology and Chemistry*, 277, pp. 32405-32408.

Malan, D.D., Buyse, J. y Decuypere, E. (2001). "Nutrition: An exogenous factor in broiler ascites". *Proceedings of the 13th European Symposium on Poultry Nutrition*, Blankenberg, Belgium, pp. 319-326.

Malan, D.D., Scheele, C.W., Buyse, J., Kwakernaak, C., Siebrits, F.K., van der Klis, J.D. y Decuypere E. (2003). "Metabolic rate and its relationship with ascites in chicken genotypes". *British Poultry Science*, 44, pp. 309-315.

Mandelker, L. (2011). "Oxidative stress, free radicals, and cellular damage". En: *Oxidative stress in applied basic research and clinical practice*. Capítulo 1, Armstrong, D. (Ed). Springer: NY, 2011, pp. 1-260.

Mann, K. y Mann, M. (2008). "The chicken egg yolk plasma and granule proteomes". *Proteomics*, 8, pp. 178-191.

Marx, J. (2004). "How cells endure low oxygen". *Science*, 303, pp. 1454-1456.

Marnett, L.J., Bienkowski, M.J., Raban, M. y Tuttle, M.A. (1979). "Studies of the hydrolysis of ¹⁴C-labeled tetraethoxypropane to malondialdehyde". *Analytical Biochemistry*, 99, pp. 458-463.

Marklund, S.L. (1984). "Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species". *Biochemistry Journal*, 222, pp. 649-655.

Martínez, S. M., Pró, M. A., Herrera, H. H., y Cuca, G. (1996). “Calidad del pollo, forma física y contenido de nutrientes del alimento en la manifestación de ascitis en pollos de engorda”. *Agrociencia*, 30, pp. 47-53.

Maxwell, M.H., Robertson, G.W. y Farquharson, C. (1996). “Evidence of ultracytochemical mitochondria derived hydrogen peroxide activity in myocardial cells from broiler chickens with an ascites syndrome”. *Research in Veterinary Science*, 61 (1), 7-12.

Maxwell, M.H., Robertson, G.W. y Mitchell, M.A. (1993). “Ultrastructural demonstration of mitochondrial calcium overload in myocardial cells from broiler chickens with ascites and induced hipoxia”. *Research in Veterinary Science*, 54 (2), pp. 267-277.

Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R. y Ratcliffe, P.J. (1999). “The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis”. *Nature*, 399, pp. 271-275.

McNabb, F.M.A. (1992). “Thyroid Hormones”. Prentice Hall, Englewood Cliffs, pp. 283. En: *Sturkie’s avian physiology sixth edition*. Capítulo 24, McNabb y Darras (Eds). Elsevier, Academic Press: NY, 2015, pp. 535-547.

McNabb, F.M.A. (2000). “Thyroids”. En: *Sturkie’s avian physiology sixth edition*. Capítulo 24, McNabb y Darras (Eds). Elsevier, Academic Press: NY, 2015, pp. 535-547.

McNabb, F.M.A. (2006). “Avian thyroid development and adaptive plastic-ity”. *General Comparative Endocrinology*, 147, pp. 93-101. En: *Sturkie’s avian physiology sixth edition*. Capítulo 24, McNabb y Darras (Eds). Elsevier, Academic Press: NY, 2015, pp. 535-547.

McNabb, F.M.A. y Darras, V.M. “Thyroids”. En: *Sturkie’s avian physiology sixth edition*. Capítulo 24, McNabb y Darras (Eds). Elsevier, Academic Press: NY, 2015, pp. 535-547.

McNabb, F.M.A. y King, D.B. (1993). "Thyroid hormone effects on growth, development and metabolism". En: Sturkie's avian physiology sixth edition. Capítulo 24, McNabb y Darras (Eds). Elsevier, Academic Press: NY, 2015, pp. 535-547.

McNabb, F.M.A., Scanes, C.G. y Zeman, M. (1998). "Endocrine control of development". En: Sturkie's avian physiology sixth edition. Capítulo 24, McNabb y Darras (Eds). Elsevier, Academic Press: NY, 2015, pp. 535-547.

Meister A. (1988). "On the discovery of glutathione". Trends in Biochemistry Science, 13 (5), pp. 185-188.

Miyata, T., Takisawa, S. y Van Ypersele de Strihou, C. (2010). "Hypoxia. 1. Intracellular sensors for oxygen and oxidative stress: novel therapeutic targets". American Journal of Cell Physiology, 300, pp. C226-C231.

Moghadam, H. K., McMillan, I., Chambers, J. R. y Julian, R. J. (2001). "Estimation of genetic parameters for ascites syndrome in broiler chickens". Poultry Science, 80, pp. 844-848.

Mohammadalipour, R., Rahmani, H.R., Jahanian, R., Riasi, A. y Mohammadalipour, M. (2017). "Effect of early feed restriction on physiological responses, performance and ascites incidence in broiler chickens raised in normal or cold environment". Animal, 11 (2), pp. 219-226.

Monge, C. y León-Velarde, F. (1991). "Physiological adaptation to high altitude: oxygen transport in mammals and birds". Physiological reviews, 71 (4), pp. 1135-1172.

Mruk, D.D., Silvestrini, B., Mo, M. y Yang-Cheng, C. (2002). "Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility". Contraception, 65, pp. 305-311.

Mugesh, G. y Singh, H.B. (2000). "Synthetic organoselenium compounds as antioxidants: glutathione peroxidase activity". Chemical Society Reviews, 29, pp. 347-357.

Nain, S., Ling, B., Bandy, B., Alcorn, J., Wojnarowics, C., Laarveld, B. y Olkowski, AA. (2008a). "The role of oxidative stress in the development of congestive heart failure in a chicken genotype selected for rapid growth". *Avian Pathology*, 37 (4), pp. 367-373.

Nain, S., Wojnarowics, C., Laarveld, B. y Olkowski, AA. (2008b). "Effects of dietary vitamin E and C supplementation on heart failure in fast growing commercial broiler chickens". *British Poultry Science*, 49 (6), pp. 697-704.

Nakanishi, K., Tajima, F., Nakamura, A., Yagura, S., Ookawara, T., Yamashita, H., Suzuki, K., Taniguchi, N. y Ohno, H. (1995). "Antioxidant system in hypobaric-hypoxia". *Journal of Physiology*, 489, pp. 869-876.

Ohh, M., Park, C.W., Ivan, M., Hoffman, M.A., Kim, T.Y., Huang, L.E., Pavletich, N., Chau, V. y Kaelin, W.G. (2000). "Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein". *Nature Cell Biology*, 2, pp. 423-427.

Ohkawa, H., Ohishi, N. y Yagui, K. (1979). "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction". *Analytical Biochemistry*, 95, pp. 351-358.

Olkowski, A.A., Wajnarowicz, C., Rathgeber, B.M., Abbott, J.A. y Classen, H.L. (2003). "Lesions of pericardium and their significance in the aetiology of heart failure in broiler chickens". *Research in Veterinary Science*, 74, pp. 203-211.

Omaye, S.T. y Tappel, A.L. (1974). "Effect of dietary selenium on glutathione peroxidase in the chick". *Journal of Nutrition*, 104, pp. 747-753.

Ostadal, B. y Kolar, F. (2007). "Cardiac adaptation to chronic high-altitude hipoxia: beneficial and adverse effects". *Respiratory Physiology and neurobiology*, 158 (2-3), pp. 224-236.

Owen, R. L., Wideman, R. F. y Cowen, B. S. (1995). "Changes in pulmonary arterial and femoral arterial blood pressure upon acute exposure to hypobaric hypoxia in broiler chickens". *Poultry Science*, 74, pp. 708-715.

Özkan, S., Plavnik, I. y Yahav, S. (2006). "Effects of early feed restriction on performance and ascites development in broiler chickens subsequently raised at low ambient temperatura". *Journal of Applied Poultry Research*, 15, pp. 9-19.

Özkan, S., Takma, C., Yahav, S., Sögüt, B., Türkmüt, L., Erturun, H. y Cahaner, A. (2010). "The effects of feed restriction and ambient temperature on growth and ascites mortality of broilers reared at high altitude". *Poultry Science*, 89, pp. 974-985.

Packer, L., Weber, S.U. y Rimbach, G. (2001). "Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signalling. *Journal of Nutrition*, 131, pp. 369S–373S.

Pakdel, A., Rabie, T., Veenendaal, T., Crooijmans, R.P.M.A., Groenen, M.A.M., Vereijken, A.L.J., Van Arendonk, J.A.M y Bovenhuis, H. (2004). "Genetic analysis of ascites-related traits in broilers". Doctoral thesis, Animal Breeding and Genetics Group, Department of Animal Sciences, Wageningen University, The Netherlands, pp. 144.

Pakdel, A., Van-Arendonk, J.A.M., Vereijken, A.L.J. y Bovenhuis, H. (2002). "Direct and maternal genetic effects for ascites-related traits in broilers". *Poultry Science*, 81, pp. 1273-1279.

Pan, J. Q., Tan, X., Li, J.C., Sun, W.D. y Wang-Professor, L. (2005). "Effects of early feed restriction and cold temperature on lipid peroxidation, pulmonary vascular remodelling and ascites morbidity in broilers under normal and cold temperatura". *British Poultry Science*, 46, (3), pp. 374-381.

Pannala, V.R., Bazil, J.N., Camara, A.K. y Dash, R.K. (2014). "A mechanistic mathematical model for the catalytic action of glutathione peroxidase". *Free Radical Research*, 48, pp. 487-502.

Pardue, S.L, y Thaxton, J.P. (1986). "Ascorbic acid in poultry: A review". *World's Poultry Science Journal*, 42, pp. 107-123.

Pastore, A., Federici, G., Bertini, E. y Piemonte F. (2003). "Analyses of Glutathione: implication in redox and detoxification". *Clinica Chimica Acta*, 333 (1), pp. 19-39.

Pettitt, A.N. (1977). "Testing the normality of several independent samples using the Anderson-Darling statistic". *Journal of the Royal Statistical Society Applied Statistics Series C*, 26 (2), pp. 156-161.

Peng, Y.Z., Wang, Y.W., Ning, D. y Guo, Y.M. (2013). "Changes of haematic parameters, redox status and mitochondrial complex activity in the heart and liver of broilers fed with different density diets under low ambient temperatura". *Avian Pathology*, 42 (4), pp. 327-334.

Plavnik, I. y Hurwitz, S. (1985). "The performance of broiler chicks during and following a severe feed restriction at an early age". *Poult Science*, 64, pp. 348-355.

Qiu-Feng, Z., Xia, Y., Ping, Z., Ke-Ying, Z., Yu-Heng, L., Xue-Mei, D., Shi-Ping, B., Jiang-Ping, W., Yue, X. y Zhuo-Wei, S. (2016). "Effects of low ambient temperatures and dietary vitamin C supplementation on pulmonary vascular remodeling and hypoxic gene expression of 21-d-old broilers". *Journal of Integrative Agriculture*, 15 (1), pp. 183-190.

R Core Team. (2015). "R: A language and environment for statistical computing". R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Radak, Z., Lee, K., Choi, W., Sunoo, S., Kizaki, T., Oh-Ishi, S., Suzuki, K., Taniguchi, N., Ohno, H. y Asano, K. (1994). "Oxidative stress induced by intermittent exposure at a simulated altitude of 4000m decreases mitochondrial superoxide dismutase content in soleus muscle of rats". *European Journal of Applied Physiology, and Occupational Physiology*. 69, pp. 392-395.

Rezaei, M. y Hajati, H. (2010). "Effect of diet dilution at early age on performance, carcass characteristics and blood parameters of broiler chicken". *Italian Journal of Animal Science*, 9, pp. 93-100.

- Roch, G., Boulianne, M. y De Roth, L. (2000). Dietary antioxidants reduce ascites in broilers”. *World Poultry*, 16(11), pp. 18-22.
- Rostagno, H. S. (2017). “Tabelas brasileiras para aves e suínos: Composicao de alimentos e exigencias nutricionais”. 4th ed. Vicosa, MG: UFV.
- Rudas, P. y Pethes, G. (1984). “The importance of the peripheral thyroid hormone deiodination in adaptation to ambient temperature in the chicken (*Gallus domesticus*)”. *Comparative Biochemistry Physiology*, 77, pp. 567-571. En: *Sturkie’s avian physiology sixth edition*. Capítulo 24, McNabb y Darras (Eds). Elsevier, Academic Press: NY, 2015, pp. 535-547.
- Ryter, S.W. y Choi, A.M. (2013). “Regulation of autophagy in oxygen-dependent cellular stress”. *Current Pharmaceutical Design*, 19 (15), pp. 2747-2756.
- Sahraei, M. (2012). “Feed Restriction in Broiler Chickens Production: A Review”. *Global Veterinaria*, 8 (5), 449-458.
- Saleh, E.A., Watkins, S.E., Waldroup, A.L. y Waldroup, P.W. (2005). “Effects of early quantitative feed restriction on live performance and carcass composition of male broilers grown for further processing”. *Journal of Applied Poultry Research*, 14, pp. 87-93.
- Salinas, G.I., Pro, M.A., Becerril, P.C., Cuca, G.J., García, M.R. y Sosa, M. E. (2004). “Restricción alimentaria en pollo de engorda para la prevención de síndrome ascítico y su efecto en el ingreso neto”. *Agrociencia*, 38, pp. 33-41.
- Semenza, G.L. (2003). “Targeting HIF-1 for cancer therapy”. *Nature Review Cancer*, 3, pp. 721-732.
- Saugstad, O.D. (2010). “Oxygen and oxidative stress in bronchopulmonary dysplasia”. *Journal of Perinatal Medicine*, 38 (6), pp. 571-577.
- Scapin, S., Leoni, S., Spagnuolo, S., Fiore, A.M. e Incerpi, S. (2009). “Short-term effects of thyroid hormones on Na⁺-K⁺-ATPase activity of chick embryo hepatocytes during development: focus on

signal transduction". American Journal of Physiology, Cell Physiology, 296, pp. C4-C12. En: Sturkie's avian physiology sixth edition. Capítulo 24, McNabb y Darras (Eds). Elsevier, Academic Press: NY, 2015, pp. 535-547.

Schafer, F.Q. y Buettner, G.R. (2001). "Redox environments of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple". Free Radical Biology and Medicine, 30, pp. 1191-1212.

Sheeran, F.L. y Pepe, S. (2006). "Energy deficiency in the failing heart: linking increased reactive oxygen species and disruption of oxidative phosphorylation rate". Biochimica et Biophysica Acta, 1757, pp. 543-552.

Scheele, C.W., De Wit, W., Frankenhuis, M.T. y Vereijken, P.F.G. (1991). "Ascites in broilers. 1. Experimental factors evoking symptoms related to ascites". Poultry Science, 70, pp. 1069-1083.

Scheele, C.W., Decuypere, E., Vereijken, P.F.G. y Schreurs, F.J.G. (1992). "Ascites in broilers. 2. Disturbances in the hormonal regulation of metabolic rate and fat metabolism". Poultry Science, 71, pp. 1971-1984.

Scheele, C.W., Van der Klis, J.D., Kwakernaak, C., Buys, N. y Decuypere, E. (2003). "Haematological characteristics predicting susceptibility for ascites. 2. High haematocrit values in juvenile chickens". British Poultry Science, 44 (3), pp. 484-489.

Schneider, J.C., Blazy, I., Dechaux, M., Rabier, D., Mason, N.P. y Richalet, J.P. (2001). "Response of nitric oxide pathway to L-arginine infusion at the altitude of 4,350 m". European Respiratory Journal, 18, pp. 286-292.

Schofield, C.J. y Ratcliffe P.J. (2004). "Oxygen sensing by HIF hydroxylases". Nature Reviews Molecular Cell Biology, 5, pp. 343-354.

Shane, S.M. (1987). "Trends in prevention of poultry disease". *Animal and Human Health*, 1 (27), pp. 36.

Sharp, P.J. y Klandorf, H. (1985). "Environmental and physiological factors controlling thyroid function in Galliformes". En: *Sturkie's avian physiology sixth edition*. Capítulo 24, McNabb y Darras (Eds). Elsevier, Academic Press: NY, 2015, pp. 535-547.

Sharp, P.J. y Klandorf, H. (1985). "Environmental and physiological factors controlling thyroid function in Galliformes". En: *Sturkie's avian physiology sixth edition*. Capítulo 24, McNabb y Darras (Eds). Elsevier, Academic Press: NY, 2015, pp. 535-547.

Shen, A.C. y Jennings, R.B. (1972). "Kinetics of calcium accumulation in acute myocardial ischemic injury". *American Journal of Pathology*, 67, pp. 441-452.

Siques, P., Brito, J. y Peña, E. (2018). "Reactive oxygen species and pulmonary vasculature during hypobaric hypoxia". *Frontiers in Physiology*, 9, 865, doi: 10.3389/fphys.2018.00865.

Siques, P., López de Pablo, ÁL., Brito, J., Arribas, S.M., Flores, K., Arriaza, K., Naveas, N., González, M.C., Hoorntje, A., León-Velarde, F. y López, M.R. (2014). "Nitric oxide and superoxide anion balance in rats exposed to chronic and long term intermittent hypoxia". *BioMed Research International*, 10. DOI: 10.1155/2014/610474

Singh, P.K., Shekar, P. y Kumar, K. (2011). "Nutritional and managemental control of ascites syndrome in poultry". *International Journal of Livestock Production*, 2(8), pp. 117-123.

Sillau, A.H., Cueva, S. y Morales, P. (1980). "Pulmonary arterial hypertension in male and female chickens at 3300 m". *Pflugers Archiv*, 386, pp. 269-275.

Smirnov, N. (2018). "Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals". *Free Radical Biology and Medicine*, xxx, pp. 1-14.

- Surai, P.F., Kochish, I.I., Fisinin, V.I. y Kidd, M.T. (2019). "Antioxidant defence systems and oxidative stress in poultry biology: An update". *Antioxidants*, 8 (235), pp. 1-36.
- Summers, R. y McNab, R. (2017). "Thyroid, parathyroid hormones and calcium homeostasis". *Anesthesia and Intensive Care Medicine*, 18 (10), pp. 522-526.
- Surai, P.F., Kochish, I.I. y Fisinin, V.I. (2018). "Glutathione peroxidases in poultry biology: Part 1. Classification and mechanisms of action". *World's Poultry Science Journal*, 74, pp. 185-198.
- Surai, P.F. (2006). "Selenium in Nutrition and Health. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Susbilla, J.P., Frankel, T.L., Parkinson, G. y Gow, C.B. (1994). "Weight of internal organs and carcass yield of early food restricted broilers". *British Poultry Science*, 35, pp. 677- 685.
- Swenson, E.R. y Bärtsch, P. (2014). "High altitude, human adaptation to hypoxia". Springer, New York, pp. 240.
- Tang, Z., Iqbal, M., Cawthon, D. y Bottje, W.G. (2002). "Heart and breast muscle mitochondrial dysfunction in pulmonary hypertension syndrome in broilers (*Gallus domesticus*)". *Comparative Biochemistry and Physiology*, 132A, pp. 527-540.
- Takeda, K., Aguila, H.L., Parikh, N.S., Li, X., Lamothe, K., Duan, L.J., Takeda, H., Lee, F.S. y Fong, G.H. (2008). "Regulation of adult erythropoiesis by prolyl hydroxylase domain proteins". *Blood*, 111, pp. 3229-3235.
- Tappel, M.E., Chaudiere, J. y Tappel, A.L. (1982). "Glutathione peroxidase activities of animal tissues". *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 73, pp. 945-949.
- Tarrant, K. J., Fulton, J. E., Ashlee, L., Rhoads, D. D. y Anthony, N. B. (2018). "Predicting ascites incidence in a simulated altitude-challenge using single nucleotide polymorphisms identified in multi-generational genome wide association studies". *Poultry Science*, 97, pp. 3801-3806.

Terashima, K., Takaya, Y. y Niwa, M. (2002). “Powerful antioxidative agents based on garcinoic acid from *Garcinia kola*”, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 10, pp. 1619-1625.

Thommes, R.C., Hylka, V.W., Tonetta, S.A., Griesbach, D.A., Ropka, S.L. y Woods, J.E. (1988). “Hypothalamic regulation of the pituitary-thyroid unit in the developing chick embryo”. *American Zoology*, 28, pp. 417-426. En: *Sturkie’s avian physiology sixth edition*. Capítulo 24, McNabb y Darras (Eds). Elsevier, Academic Press: NY, 2015, pp. 535-547.

Tottori, J., Yamaguchi, R., Murakawa, Y., Sato, M., Uchida, K. y Tateyama, S. (1997). “The use of feed restriction for mortality control of chickens in broiler farms”. *Avian Diseases*, 41, pp. 433-437.

Towsend, D., Tew, K. y Tapiero, H. (2003). “The importance of glutathione in human disease”. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 57 (3-4), pp. 145-55.

Urdaneta-Rincón, M. y Leeson, S. (2002). “Quantitative and Qualitative Feed Restriction on Growth Characteristics of Male Broiler Chickens”. *Poultry Science*, 81, pp. 679-688.

Van der Klein, S.A.S., Silva, F.A., Kwakkel, R.P. y Zuidhof, M.J. (2017). “The effect of quantitative feed restriction on allometric growth in broilers”. *Poultry Science*, 96, pp. 118-126.

Van der Spek, A. H., Fliers, E. y Boelen, A. (2017). “The classic pathways of thyroid hormones metabolism”, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 458, pp. 29-38.

Van Herck, S.L., Geysens, S., Delbaere, J., Tylzanowski, P. y Darras, V.M. (2012). “Expression profile and thyroid hormone responsiveness of trans-porters and deiodinases in early embryonic chicken brain development”. *Molecular Cell Endocrinology*, 349, pp. 289-297.

Verhoelst, C.H., Darras, V.M., Doulabi, B.Z., Reyns, G., Kuhn, E.R. y Van der Geyten, S. (2004). “Type I iodothyronine deiodinase in euthyroid and hypothyroid chicken cerebellum”. *Molecular Cell Endocrinology*, 214, pp. 97-105. En: *Sturkie’s avian physiology sixth edition*. Capítulo 24, McNabb y Darras (Eds). Elsevier, Academic Press: NY, 2015, pp. 535-547.

- von Sonntag, C. (1987). "The Chemical Basis of Radiation Biology". Taylor & Francis, London.
- Walter, I. y Seebacher, F. (2009). "Endothermy in birds: underlying molecular mechanisms". *Journal of Experimental Biology*, 212, pp. 2328-2336.
- Walton, J.P., Bond, J.M., Julian, R.J. y Squires, E.J. (1999). "Effect of dietary flax oil and hypobaric hypoxia on pulmonary hypertension and haematological variables in broiler chickens". *British Poultry Science*, 40, pp. 385-391.
- Wang, J. y Dong, W. (2018). "Oxidative stress and bronchopulmonary displasia". *Gene*, 678, pp. 177-183.
- Waypa, G.B., Dudley, V. y Schumacker, P.T. (2016). "Role of pulmonary arterial smooth muscle and endothelial mitochondrial complex III in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension". *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 193, A3884.
- Wentworth, B.C. y Ringer, R.K. (1986). "Thyroids". En: *Sturkie's avian physiology sixth edition*. Capítulo 24, McNabb y Darras (Eds). Elsevier, Academic Press: NY, 2015, pp. 535-547.
- Whitehead, C.C. y Keller, T. (2002). "An update on ascorbic acid in poultry". *World's Poultry Science*, 59, pp. 161-184.
- Wideman, R. F. (1999). "Cardiac output in four-, five- and six-week old broilers, and hemodynamic responses to intravenous injections of epinephrine". *Poultry Science*, 78, pp. 392-403.
- Wideman, R. F. (2001). "Pathophysiology of heart/lung disorders: Pulmonary hypertension syndrome in broiler chickens". *World's Poultry Science Journal*, 57, pp. 289-307.
- Wideman, R. F. y Bottje, W. G. (1993). "Current understanding of the ascites syndrome and future research directions". En: *Nutrition and Technical Symposium Proceedings*. Novus International Inc., St. Louis, MO, pp.1-20.

Wideman, R. F., Chapman, M. F., Hamal, K. R., Bowen, O. T., Lorenzoni, A. G., Erf, G. F. y Anthony, N. B. (2007). "An inadequate pulmonary vascular capacity and susceptibility to pulmonary arterial hypertension in broilers". *Poultry Science*, 86, pp. 984-998.

Wideman, R. F., Hamal, K. R., Bayona, M. T., Lorenzoni, A. G., Cross, D., Khajali, F., Rhoads, D. D., Erf, G. F. y Anthony, N. B. (2011). "Plexiform lesions in the lungs of domestic fowl selected for susceptibility to pulmonary arterial hypertension: incidence and histology". *Anatomical Record*, 294, pp. 739-755.

Wideman, R.F. (1988). "Ascites in poultry". *Monsanto Nutrition Update*, 6 (2), pp. 1-7.

Wideman, R.F. (2000a). "Cardio-pulmonary hemodynamics and ascites in broiler chickens". *Avian and Poultry Biology Review*, 11, pp. 21-43.

Wideman, R.F. y Tackett, C. (2000b). "Cardiopulmonary function in broilers reared at warm or cold temperatures: Effect of acute inhalation of 100% oxygen". *Poultry Science*, 79, pp. 257-264.

Wideman, R.R., Rhoads, D.D., Erf, G.F. y Anthony, N.B. (2013). "Pulmonary arterial hypertension (ascites syndrome) in broilers: A review". *Poultry Science*, 92, pp. 64-83.

Wijtten, P.J.A., Hangoor, E., Sparla, J.K.W.M. y Verstegen, M.W.A. (2010). "Dietary amino acid levels and feed restriction affect small intestinal development, mortality, and weight gain of male broilers". *Poultry Science*, 89, pp. 1424-1439.

Williamson, R.A., Mission, B.H. y Davison, T.F. (1985). "The effect of exposure to 40 C on the heat production and the serum concentrations of triiodothyronine, thyroxine, and corticosterone in immature domestic fowl". *General Comparative Endocrinology*, 60, pp. 178-186. En: *Sturkie's avian physiology sixth edition*. Capítulo 24, McNabb y Darras (Eds). Elsevier, Academic Press: NY, 2015, pp. 535-547.

Winterbourn, C.C. y Hampton, M.B. (2008). "Thiol chemistry and specificity in redox signaling". *Free Radical Biology and Medicine*, 45 (5), pp. 549-561.

Wiener, C.M., Booth, G. y Semenza, G.L. (1996). “In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1”. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 225, pp. 485-488.

Wong, R.S. y Radhakrishnan, A.K. (2012). “Tocotrienol research: past into present”. *Nutrition Review*, 70, pp. 483-490.

Xiang, R.P., Sun, W.D., Wang, J.Y. y Wang, X.L. (2002). “Effect of vitamin C on pulmonary hypertension and muscularisation of pulmonary arterioles in broilers”. *British Poultry Science*, 43, pp.705-712.

Yamaguchi, S., Aoki, N., Kitajima, T., Iikubo, E., Katagiri, S., Matsu-shima, T. y Homma, K.J. (2012). “Thyroid hormone determines the start of the sensitive period of imprinting and primes later learning”. *Nature Communication*, 3, pp. 1081. En: *Sturkie’s avian physiology sixth edition*. Capítulo 24, McNabb y Darras (Eds). Elsevier, Academic Press: NY, 2015, pp. 535-547.

Yang, X., Luo, Y.H., Zeng, Q.F., Zhang, K, Y., Ding, X.M., Bai, S.P. y Wang, J.P. (2014). “Effects of low ambient temperatures and dietary vitamin C supplement on growth performance, blood parameters, and antioxidant capacity of 21-day-old broilers”. *Poultry Science*, 93, pp. 898-905.

Yousefi, A., Khajali, F., Hassanpour, H. y Khajali, Z. (2013). “Dietary L-carnitine improves pulmonary hypertensive response in broiler chickens subjected to hypobaric hypoxia”. *The Journal of Poultry Science*, 50, pp. 143-149.

Yu, B., Meng, F., Yang, Y., Liu, D. y Shi, K. (2016). “NOX2 antisense attenuates hypoxia-induced oxidative stress and apoptosis in cardiomyocyte”. *International Journal of Medical Sciences*, 13, pp. 646-652

Yu, A.Y., Frid, M.G., Shimoda, L.A., Wiener, C.M., Stenmark, K. y Semenza, G.L. (1998). “Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung”. *American Journal of Physiology- Lung Cell Molecular Physiology*, 275, pp. L818-L826.

Zhan, X.A., Wang, M., Ren, H., Zhao, R.Q., Li, J.X y Tan , Z. L. (2007). “Effect of Early Feed Restriction on Metabolic Programming and Compensatory Growth in Broiler Chickens”. *Poultry Science*, 86, pp. 654-660.

Zhang, J., Feng, X., Zhao, L., Wang, W., Gao, M., Wu, B. y Qiao, J. (2013). “Expression of hypoxia-inducible factor 1 α mRNA in hearts and lungs of broiler chickens with ascites syndrome induced by excess salt in drinking wáter”. *Poultry Science*, 92, pp. 2044-2052.

Zhang, L. F., Lian, L. S., Zhao, C. J., Li, J. Y., Bao, H. G. y Wu. C. (2007). “Expression pattern of HIF1 α mRNA in brain, heart and liver tissues of Tibet chicken embryos in hypoxia revealed with quantitative real-time PCR”. *Animal*, 2, pp. 1467-1471.

Zhou, D.H, Wu, J., Yang, S.J., Cheng, D.C. y Guo, D.Z. (2008). “Intravenous endothelin-1 triggers pulmonary hypertension syndrome (ascites) in broilers”. *Veterinari Medicina*, 53, pp. 381-391.

Zuidhof, M.J., Schneirder, B.L., Carney, V.L., Korver, D.R. y Robinson, F. E. (2014). “Growth, efficiency, and yield of commercial broilers from 1957, 1978, and 2005”. *Poultry Science*, 93, pp. 2970-2982.

Zuo, L., Zhou, T. y Pannell, B.K. (2015). “Biological and physiological role of reactive oxygen species—the good, the bad and the ugly”. *Acta Physiologica*, 214 (3), pp. 329-348.

Zubair, A. K. y Leeson, S. (1994). “Effect of early feed restriction and realimentation on heat production and changes in sizes of digestive organs of male broilers”. *Poultry Science*, 73, pp. 529-538.