

Título del proyecto de investigación

SOLICITUD DE EXTENSIÓN DEL PROYECTO:

Límite aeróbico en aves primitivas, distinción entre efectos filogenéticos y adaptativos en la Pisacca (*Nothoprocta ornata*) a nivel metabólico y cardiovascular.

Autores:

Prof. Dr. Luis Álvaro Garitano-Zavala Burgos

Profesor Titular

Unidad de Manejo y Conservación de Fauna, Carrera de Biología/Instituto de Ecología
Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia. agaritanoz@gmail.com

Prof. Dr. Jordi Altimiras Conderroure

Profesor Asociado

Departamento de Física, Química y Biología (IFM)

Universidad de Linköping, Linköping, Suecia. jordi.altimiras@liu.se

Ing. Orlando N. Arce Cabrera

Director

Centro de Investigación y Producción de Animales Menores (CIPAM), Departamento de Ciencia Animal, Facultad de Ciencias Agrarias y Naturales de la Universidad Técnica de Oruro, Oruro, Bolivia. onarcecec@hotmail.com

Introducción

La Pisacca (*Nothoprocta ornata*) pertenece a la familia de las Tinamidae (Tinamúes), distribuida exclusivamente en el Neotrópico. A nivel evolutivo los tinamúes pertenecen, junto con las ratites (avestruces, ñandúes y especies relacionadas), a las aves más primitivas denominadas paleognatas (Harshman et al., 2008). A diferencia de las ratites, sin embargo, los tinamúes tienen el esternón quillado y pueden volar aunque de forma rudimentaria, lo que los ha llevado a clasificar como aves de vuelo corto, consideración que comparten con las gallináceas, gallinas y pavos (Viscor and Fuster, 1987).

Los estudios de nuestro grupo de investigación alrededor de la ecología y el manejo de la pisacca en cautividad nos han proporcionado datos muy interesantes en relación a la dieta (Garitano-Zavala et al. 2003), el desarrollo postnatal en cautiverio (Molina 2005), comportamiento (Gismondi 2005) y la capacidad reproductiva de la Pisacca en cautiverio (Garitano-Zavala et al. 2004, 2005). Es precisamente a partir del conocimiento de la biología reproductiva en cautiverio que se ha sugerido la dificultad de emprender su crianza en cautiverio con fines productivos (Garitano-Zavala 2010).

A pesar de estos conocimientos detallados de la historia natural y la ecología de la *Pisacca*, poco conocemos de su fisiología porque hay muy pocos estudios dedicados al tema. El aspecto más comúnmente mencionado en relación a la fisiología de los tinamúes es el tamaño relativamente pequeño de su corazón (Hartman, 1961; Magnan, 1922), muy inferior al del resto de especies de aves como se demuestra en la Figura 1.

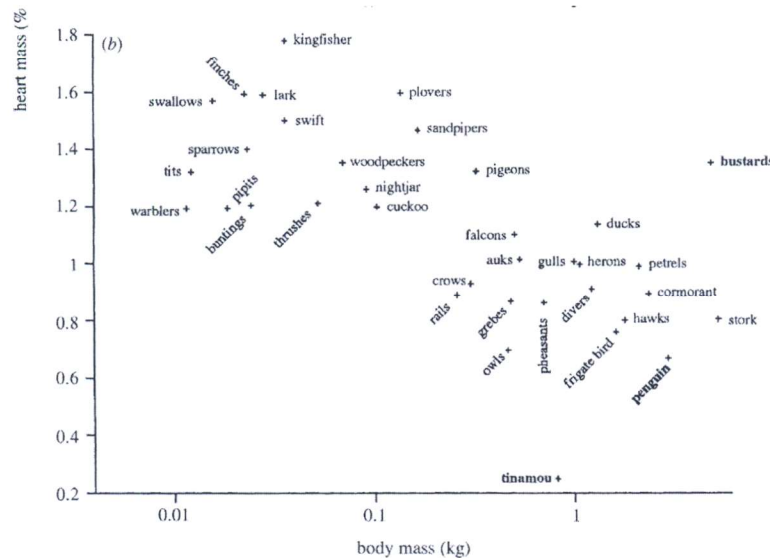


Figura 1. Tamaño relativo del corazón en relación a la masa corporal (Bishop, 1997)

Es importante destacar que estos resultados son bastante circunstanciales basados en pocos individuos de distintas especies. Así pues, no hay ningún estudio exhaustivo de la morfología del corazón de tinamúes en ninguna especie.

Precisamente debido al pequeño tamaño del corazón se ha inferido que la capacidad aeróbica de los tinamúes limita su capacidad de vuelo (Bishop, 1997, 1999, 2005). Sin embargo este hecho no deja de ser una suposición por analogía entre el tamaño reducido y el mediocre desempeño en el vuelo común en todos los tinamúes (Cabot 1992, Davies 2002).

El único trabajo sobre el metabolismo de tinamúes ha sido realizado con el Tinamu Chileno (*Nothoprocta perdicaria*) por Withers (1987), quien indica que la tasa metabólica basal es considerablemente inferior a la de otras aves, pero superior a la de avestruces (Tabla 1).

	Tinamou	Ratite	Carinate
Body temperature (°C)	39.6 ± 0.2	38–40 ^{a,b,c}	39–42 ^d
Basal $\dot{V}O_2$ (ml·g ⁻¹ ·hr ⁻¹)	0.69 ± 0.03	0.48 ^{a,e}	0.98 (α) ^f
Wet conductance (ml O ₂ ·g ⁻¹ ·hr ⁻¹ ·°C ⁻¹)	0.026–0.039	—	0.049 ^g
Dry conductance (ml O ₂ ·g ⁻¹ ·hr ⁻¹ ·°C ⁻¹)	0.025	—	0.027 ^g
Lower critical temperature (°C)	9.8	—	20 ^h
Evaporative water loss (mg·g ⁻¹ ·hr ⁻¹) (20–30°C)	1.49 ± 0.14	—	1.37 ^h
EWL/ $\dot{V}O_2$ (18–30°C)	2.07 ± 0.07	2.1 ^a	1.40 ^h

Tabla 1. Tasa metabólica comparativa del tinamú chileno, el avestruz y la gallina (Withers et al., 1987)

Estos resultados, sin embargo, están limitados a situación de reposo por lo que no se tenía ningún conocimiento de la capacidad metabólica máxima en ninguna especie de tinamú a pesar de que las predicciones mencionadas anteriormente indicarían que serían inferiores a la del resto de aves. Por consiguiente, la Pisacca es una especie de gran interés por cuanto se trata de un ave primitiva con un corazón relativamente pequeño. Por ello el estudio de su capacidad metabólica y cardiovascular y de las posibles adaptaciones asociadas con estos sistemas tiene un interés biomédico y evolutivo.

Desde el año 2010 nuestro equipo de investigación ha ido trabajando con varios aspectos de la morfología cardíaca y fisiología cardíaca y ventilatoria de la Pisacca (*Nothoprocta ornata*). Se han obtenido resultados que apuntan a la enorme influencia que tiene la morfología cardíaca sobre el metabolismo general de los tinamúes. Las diferentes investigaciones están completando cada vez mejor la comprensión del escenario general de lo que un corazón pequeño en un ave voladora representa en su fisiología endoterma, y a partir de esto seleccionamos la importancia de estudiar la fisiología “en marcha” del corazón mediante ecocardiografía, y la relación de los parámetros fisiológicos con la actividad en tejidos clave de enzimas involucradas con la fisiología en condiciones de hipoxia. Al mismo tiempo hemos descubierto que el tamaño del corazón difiere del de otras especies de aves sólo a partir de estadios juveniles, lo que interpretamos como indicador que la capacidad proliferativa en el corazón de la Pisacca es inferior al de otras especies de aves, hecho que pretendemos investigar también. Finalmente, un aspecto que no fue posible determinar en las investigaciones precedentes, fue la tasa metabólica en ejercicio progresivo medido en tiempo real, debido a que no pudo optimizarse la determinación de la tasa de consumo de oxígeno en flujo abierto. En esta ocasión consideramos que podremos optimizar el sistema de medición en flujo abierto para lograrlo.

Objetivo general y objetivos específicos

El objetivo general de nuestro proyecto es llevar a cabo una caracterización de la respuesta de la Pisacca a situaciones de ejercicio sostenido a nivel metabólico, cardiovascular y respiratorio. Los trabajos se realizan en colaboración con el Dr.Jordi Altimiras de la Universidad de Linköping, en Suecia. Para ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Ecocardiografía del corazón en respuesta a estimulación inotrópica mediante agonistas beta-adrenérgicos para determinar la respuesta máxima del corazón
2. Determinación de los perfiles bioquímicos y enzimáticos en músculo cardíaco, músculo esquelético, cerebro e hígado.
3. Determinación de la capacidad proliferativa de las células del miocardio del corazón de la Pisacca en respuesta a hormonas.
4. Evaluación de la tasa metabólica máxima mediante ejercicio gradual en corredora utilizando técnicas de respirometría de flujo abierto.
5. Determinación de los niveles de glucosa y lactato en sangre en condiciones de ejercicio gradual.

Antecedentes para la solicitud de extensión del proyecto

El proyecto “Límite aeróbico en aves primitivas, distinción entre efectos filogenéticos y adaptativos en la Pisacca (*Nothoprocta ornata*) a nivel metabólico y cardiovascular” fue autorizado para su ejecución por la Dirección General de Biodiversidad para el periodo 2013-2015. Se cumplieron con algunos de los objetivos de forma completa (la medición de los cambios morfofuncionales de las cámaras cardíacas mediante ecocardiografía de ultrasonidos en animales anestesiados, y la determinación de los perfiles bioquímicos y enzimáticos en músculo cardíaco, músculo esquelético e hígado), pero los demás de forma parcial, y esto se debió a que a lo largo del periodo de investigación previsto, no se pudo optimizar un adecuado método para la evaluación de la tasa metabólica máxima mediante ejercicio gradual en corredora utilizando técnicas de respirometría de flujo abierto. El principal problema radicó en la dificultad de contar con una medida robusta de las variaciones de concentración de oxígeno en la cámara, por ser de un volumen grande y por estar abierta por la parte inferior, pues los animales deben correr sobre la corredora al momento de hacer las mediciones.

A lo largo de este tiempo, en la Universidad de Linköping, se han probado diversos protocolos para optimizar la técnica y durante el año 2016 utilizando pollos domésticos, y se han obtenido mejores resultados, de manera que consideramos posible poder realizar estas mediciones y lograr alcanzar los objetivos propuestos en el año 2013, durante una extensión del proyecto entre los años 2017-2019. Otro de los objetivos que no se alcanzó es la determinación de la capacidad proliferativa de células cardíacas en respuesta a hormonas, debido a que los tejidos no llegaron en buenas condiciones a la Universidad de Linköping.

Actualmente, se cuenta con el interés del Centro de Investigación y Producción de animales Menores (CIPAM), Facultad de Ciencias Agrarias y Naturales (FCAN) de la Universidad Técnica de Oruro (UTO), para participar en esta investigación. Ellos podrán mantener los individuos de pisaccas (*Nothoprocta ornata*) en su centro de crianza, para poder utilizarlas en las evaluaciones en vivo sea en el campus universitario de Oruro, como en el campus universitario de La Paz, según las mediciones a realizarse que dependen del equipo a usarse.

Diseño de investigación

El diseño experimental incluye 30 individuos de Pisaccas (*Nothoprocta ornata*). El procedimiento experimental incluye la exposición de los animales a un ejercicio en carrera controlada a velocidades progresivamente más altas, partiendo desde 1 km h^{-1} hasta llegar a la fatiga. En función de otros estudios se estima que la velocidad máxima sería de 5 km h^{-1} .

Con base a los escasos conocimientos previos de la fisiología de otras especies de tinamúes, nuestra predicción es que la Pisacca tendrá una capacidad aeróbica inferior a la de la gallina, tanto en situación de reposo como en situación de máxima fatiga. Esta predicción se verá reflejada en un aumento de lactato en sangre, una disminución de la tasa metabólica y una respuesta cardiorrespiratoria más acentuada después de un período estándar de actividad máxima.

Descripción detallada de los procedimientos de investigación

Obtención de los animales en el Altiplano

Para reiniciar esta fase de extensión, se capturarán vivos treinta individuos de *Pisacca (Nothoprocta ornata)* en las localidades de Toledo y Curahuara de Carangas en el departamento de Oruro. Estas localidades han sido elegidas por el Centro de Investigación y Producción de animales Menores (CIPAM), pues cuentan con acuerdos con los Municipios y se ha evaluado la presencia de grandes poblaciones de *Pisacca* que inclusive se menciona que afectan a los cultivos de papa. Los comunarios pueden colaborar en la captura de animales en vivo, con diversos métodos que garantizan la captura de ejemplares sin provocarles daños. Las aves serán trasladadas el mismo día a las instalaciones del CIPAM en Oruro.

Cuidado de los animales

Los animales serán mantenidos en el CIPAM, donde se cuenta con un espacio de un cuarto de hectárea donde se han instalado jaulas para la crianza grupal de los 30 ejemplares. Agua y alimento balanceado serán proporcionados diariamente ad libitum, así como complementos nutritivos en forma de papa picada y alfalfa fresca. La experiencia de crianza en cautiverio de esta especie data desde el año 2000 habiéndose demostrado ampliamente la factibilidad de la misma. Todos los animales están anillados y su peso es monitorizado semanalmente. El manejo de los animales implica la manutención a lo máximo de las condiciones naturales (suelo de tierra, vegetación natural y exposición a condiciones climáticas naturales) y la mínima interferencia humana posible durante el día.

Condiciones de ejercicio en corredora

Una corredora del mismo tipo que las utilizadas para entrenar personas será empleada para monitorizar las aves en condiciones de ejercicio controlado. El protocolo de carrera (duración y velocidad) será establecido una vez hayamos podido determinar las mejores condiciones de carrera para las pisaccas.

Determinación de la tasa metabólica

Para determinar la tasa metabólica los animales se colocarán en contenedores abiertos de plástico en un ambiente termoneutral (Withers et al., 1987). El flujo de aire a través del respirómetro se mantendrá estable a 1.2 litros por minuto utilizando el equipo adecuado (FOXBOX Field Oxygen System, Sable Systems Inc., Las Vegas, Nevada, USA) y procedimientos previamente descritos (Gräns, 2006). A partir de la diferencia en la concentración de oxígeno en el aire entrante y saliente es posible calcular la tasa metabólica del animal (Withers et al., 1987; Melanson et al., 2010; Ellerby et al., 2003). Los contenedores son opacos para evitar molestar al animal durante la medida. Los animales se mantienen en el contenedor un período de 60-90 minutos después de someterlos a las distintas experiencias de descanso y fatiga.

Extracción de sangre

300 microlitros de sangre son obtenidos por punción de la vena braquial después de la desinfección del área con etanol al 70%. La sangre se utilizará para la determinación de glucosa y lactato después de someter a los individuos a distintos niveles de ejercicio.

Para la determinación de glucosa se utilizará un medidor clínico de glucosa (Accu-Check Aviva de Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) que ha sido convenientemente validado para sangre de aves utilizando un método enzimático de glucosa en plasma (BioVision Glucose Enzymatic Kit, Mountain View, CA, USA). Para la determinación de lactato se utilizará el medidor electroenzimático Lactate-Pro (Arkray Inc, Kyoto, Japón) que ha sido convenientemente validado para sangre de aves utilizando un método enzimático (L-Lactate test Kit de Randox Laboratories Ltd., Crumlin, Reino Unido).

Eutanasia de los animales

Se realizará por decapitación de ocho individuos, puesto que es, de entre los métodos aceptados para sacrificar aves, aquel que induce un menor sufrimiento en los animales puesto que es rápido, efectivo e irreversible, al contrario que la eutanasia por inyección de pentobarbital (lenta inducción) o por sofocamiento con dióxido de carbono (convulsiones antes de la muerte).

Procesado de tejidos, ensayos bioquímicos, enzimáticos y celulares

Muestras corazón serán obtenidas por disección post-mortem y preservadas por congelación a -80°C para el ensayo de la capacidad proliferativa de células cardíacas. Esta se realizará tras el aislamiento y la purificación de células, la proliferación celular en respuesta a IGF1 (factor de crecimiento 1), T3 (hormona tiroidea) y angiotensina se realizará mediante técnicas espectrofotométricas.

Resultados esperados:

1. Resultados de tasa metabólica de 30 individuos sometidos a protocolos de reposo y ejercicio a diferentes niveles de esfuerzo, relacionada a los parámetros hematológicos de glucosa y lactato. Determinación del desempeño metabólico a máximo esfuerzo.
2. Resultados de la capacidad proliferativa de células cardíacas en respuesta a IGF1 y T3.

Referencias

- Bishop, C.M., 1997. Heart mass and the maximum cardiac output of birds and mammals: implications for estimating the maximum aerobic power input of flying animals. *Phil.Trans.Roy.Soc.London.B.* 352, 447-456.
- Bishop, C.M., 1999. The maximum oxygen consumption and aerobic scope of birds and mammals: getting to the heart of the matter. *Proc.Roy.Soc.London.Ser.B.* 266, 2275-2281.

- Bishop, C.M., 2005. Circulatory variables and the flight performance of birds. *J.exp.Biol.* 208, 1695-1708.
- Burton, R.R., Smith, A.H., 1969. Induction of cardiac hypertrophy and polycythemia in the developing chick at high altitude. *Fed.Proc.* 28, 1170-1177.
- Ellerby, D.J., Cleary, M., Marsh, R.L., Buchanan, C.I., 2003. Measurement of maximum oxygen consumption in guinea fowl *Numida meleagris* indicates that birds and mammals display a similar diversity of aerobic scopes during running. *Physiol.Biochem.Zool.* 76, 695-703.
- Gräns, A., (2006). Oxygen consumption, embryonic vocalizations and embryonic movements as means of feto-maternal interactions in broiler chickens, *Gallus gallus domesticus*, IFM / Biology. Linköpings universitet, Linköping.
- Harshman, J., Braun, E.L., Braun, M.J., Huddleston, C.J., Bowie, R.C.K., Chojnowski, J.L., Hackett, S.J., Han, K.-L., Kimball, R.T., Marks, B.D., Miglia, K.J., Moore, W.S., Reddy, S., Sheldon, F.H., Steadman, D.W., Steppan, S.J., Witt, C.C., Yuri, T., 2008. Phylogenomic evidence for multiple losses of flight in ratite birds. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA.* 105, 13462-13467.
- Hartman, F.A., 1961. Locomotor mechanisms of birds. *Smithsonian Miscellaneous Collections* 143, 1-91.
- Julian, R.J., Squires, E.J., 1994. Haematopoietic and right ventricular response to intermittent hypobaric hypoxia in meat-type chickens. *Avian Pathol.* 23, 539-545.
- Magnan, A., 1922. Les caractéristiques des oiseaux suivant le mode de vol. *Ann.Sci.Nat.Zool.Biol.Anim.* 10, 125-334.
- Melanson, E.L., Ingebrigtsen, J.P., Bergouignan, A., Ohkawara, K., Kohrt, W.M., Lighton, J.R.B., 2010. A new approach for flow-through respirometry measurements in humans. *Amer.J.Physiol.Regul.Integr.Comp.Physiol.* 298, R1571-R1579.
- Savory, C.J., Kostal, L., 1997. Application of a radiotelemetry system for chronic measurement of blood pressure, heart rate, EEG, and activity in the chicken. *Physiol.Behav.* 61, 963-969.
- Savory, C.J., Kostal, L., Nevison, I.M., 2006. Circadian variation in heart rate, blood pressure, body temperature and EEG of immature broiler feeder chickens in restricted-fed and *ad libitum*-fed states. *Brit.Poultry.Sci.* 47, 599-606.
- Viscor, G., Fuster, J.F., 1987. Relationships between morphological parameters in birds with different flying habitats. *Comp.Biochem.Physiol.A.* 87, 231-249.
- Withers, P.C., Forbes, R.B., Hedrick, M.S., 1987. Metabolic, water and thermal relations of the Chilean Tinamou. *The Condor* 89, 424-426.