

Endothelin-1 expression in pulmonary hypertensive chickens by hypoxia

Expresión de Endotelina-1 en pollos con hipertensión arterial pulmonar por hipoxia hipobárica

Luis Carlos Monroy G¹ M.Sc, Aureliano Hernández V^{1*} Ph.D.

¹Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Bogotá, Colombia. Correspondence: ahernandezv@unal.edu.co

Received: July 2016; Accepted: January 2017.

ABSTRACT

Objective. To determine the effect of hypobaric hypoxia exposition in pulmonary arterioles expression of endothelin-1 (ET-1). **Materials and methods.** Two groups of commercial broiler chickens were used: one of them were raised at 2638 (hypobaric hypoxia) and the other one at 300 m (relative normoxia) above sea level. Incidence of pulmonary hypertension (PH) was evaluated by calculating the cardiac mass index values and ET-1 protein expression was established in pulmonary arterioles by immunohistochemistry and morphometry. **Results.** ET-1 expression was higher in arterioles of animals exposed to hypoxia as compared to the low altitude exposed broilers ($p < 0.01$). Arterioles from pulmonary hypertensive chickens (PHC) showed ET-1 higher expression than arterioles from healthy chickens (non-hypertensive, NHC) at low altitude, those exposed to hypobaric hypoxia ($p < 0.01$). 53% of chickens subjected to altitude conditions developed pulmonary hypertension. Under normoxia, no chickens developed that pathology. **Conclusions.** Quantitative characteristics and sites of ET-1 expression in the lungs are important in the understanding of PH pathogenesis in broilers and the adapting mechanisms to hypobaric hypoxia, as to design new pharmacological approaches. This is a first approach which accounts for the abovementioned features in broilers subjected to natural conditions of normoxia and hypobaric hypoxia.

Keywords: Arterioles, endothelin-1, pulmonary hypertension, morphometry, immunohistochemistry (*Source: CAB*).

RESUMEN

Objetivo. Determinar el efecto de la exposición a hipoxia hipobárica sobre la expresión de Endotelina-1 en arteriolas pulmonares. **Material y métodos.** Se utilizaron 2 grupos de pollos de engorde de una estirpe comercial: uno de ellos criados a 2638 y el otro, a 300 m de altitud. La incidencia de HAP se evaluó según los valores del índice de masa cardíaca y se compararon los niveles de expresión de la proteína ET-1 en arteriolas pulmonares de pollos de engorde sanos y enfermos por HAP mediante inmunohistoquímica y morfometría. **Resultados.** La expresión de la proteína ET-1 fue mayor en las arteriolas de los pollos expuestos a hipoxia hipobárica que en los criados bajo condiciones de normoxia

relativa ($p < 0.01$). Los animales enfermos por HAP presentaron mayor expresión de la proteína ET-1 en las arteriolas pulmonares que los animales sanos ubicados en las dos altitudes ($p < 0.01$). 53% de los animales desarrollaron hipertensión pulmonar y ninguno de los mantenidos en normoxia lo hicieron. **Conclusiones.** El conocimiento de las características cuantitativas y los sitios de expresión de la ET-1 son elementos importantes para entender aún más la patogenia de la HAP y el diseño de fármacos para su control. Este estudio constituye la primera aproximación cuantitativa relacionada con la expresión de ET-1 en pollos de engorde con HAP de origen hipóxico no inducida.

Palabras clave: Arteriolas, endotelina-1, hipertensión pulmonar, morfometría, inmunohistoquímica (Fuente: CAB).

INTRODUCTION

During the last 40 years, pulmonary hypertension (PH) has been reported in genetically susceptible broilers exposed to hypobaric hypoxia (1-3).

The endothelium of pulmonary arterial branches releases vasoconstrictor and vasodilator molecules, which, in physiological conditions should be kept in an adequate balance. Under prolonged hypoxic conditions, transcription molecules such as the hypoxia induced factor 1 (HIF-1), induce liberation of vasoconstrictors such as endothelin-1 (ET-1). When this compensatory mechanism is sustained as to increase pulmonary arterial blood flow and overpass physiological levels, PH occurs (4,5). Also, nitric oxide synthase sequester can develop, thus inhibiting vasodilatation due to decrease in nitric oxide (6). This endothelial dysfunction, vasoconstrictors predominate and vascular remodeling ensues, which entails thickening of the middle muscle and the adventitia layers in arterioles (5). ET-1 appears as the most potent vasoconstrictor in the pulmonary vasculature, and the use of ET-1 inhibitors of correspondent receptors, like bosentan and intestinal vasoactive peptide to control PH has been proposed (7,8).

Given that there are diverse molecular systems which act as vasoconstrictors, it is desirable to define the degree of ET-1 participation in the pulmonary vascular response to hypoxia, in a view to contribute in the knowledge of an indicator of adaptation to hypoxia, and support future pharmacological studies which pursue the control of PH.

In a previous study a greater ET-1 mRNA expression was encountered in hypoxic pulmonary hypertensive chickens (PHC) as compared to non-hypertensive ones (NPHC) (9), but the knowledge of protein expression and correspondent sites is not defined as yet.

The aim of the present work was to quantitate ET-1 expression in the muscle layer of pulmonary

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos 40 años, la hipertensión pulmonar (HP) se ha reportado en pollos de engorde susceptibles genéticamente, sometidos a hipoxia hipobárica (1-3).

El endotelio de las ramas de la arteria pulmonar libera moléculas vasoconstrictoras y vasodilatadoras, que en condiciones fisiológicas, deben mantenerse en balance adecuado. En condiciones de hipoxia prolongada, moléculas de transcripción como el factor inducible por la hipoxia 1 (HF-1), inducen la liberación de vasoconstrictores como la endotelina-1 (ET-1). Cuando este mecanismo compensatorio se mantiene para incrementar el flujo de sangre arterial y sobrepasa los niveles fisiológicos, sobreviene la HP (4,5). Así mismo, puede ocurrir el secuestro de la sintasa de óxido nítrico y así se inhibiría la vasodilatación por la disminución de óxido nítrico (6). En esta disfunción endotelial predominan los vasoconstrictores y ocurre una remodelación vascular, que incluye el engrosamiento de la media muscular y de la adventicia en arteriolas (5). ET-1 aparece como el vasoconstrictor más potente en las arterias pulmonares y el uso de los inhibidores de la ET-1; se ha propuesto el uso del bosentan y sus receptores, amén del péptido intestinal vasoactivo (7,8).

Dado que hay diversos sistemas moleculares que actúan como vasoconstrictores, es deseable definir el grado de participación de la ET-1 en la respuesta vascular a la hipoxia, para contribuir al conocimiento de un indicador de adaptación a la hipoxia y servir como base para futuros trabajos en farmacología, que puedan controlar la HP.

En un estudio anterior, se encontró una mayor expresión del mRNA de la ET-1 en pollos con HP (PHP) que en los no hipertensos (PNH)(9), pero el conocimiento de la expresión de la ET-1 y sus correspondientes sitios, aun no se ha definido.

El objetivo del presente estudio fue cuantificar la expresión de ET-1 en la media muscular de arteriolas en PHP y PNH, bajo condiciones de normoxia e hipoxia hipobárica.

arterioles of PHC and NPH ones, maintained under normoxia and hypobaric hypoxia.

MATERIALS AND METHODS

Animals and studies locations. Five hundred commercial broilers were chosen from one commercial incubating industry located at 300m above sea level (masl). One group of animals (145 chickens) were maintained at 2638 masl in Bogotá, Colombia, with a barometric pressure of 560 Hg mm, oxygen partial pressure, 117 Hg mm, and the other group were raised at 300 masl (Nilo, Colombia) under relative normoxia: barometric pressure, 740 Hg mm and oxygen partial pressure, 155 Hg mm. All animals were subjected to standard feeding and health procedures and temperature control was assessed, as to avoid obtaining readings below 20°C.

Sampling and analytical procedures. Thirty three-old chickens were slaughtered by cervical dislocation, as recommended and approved by the institutional ethical committee. PH occurrence was established by calculating the cardiac index mass (CI), obtained by calculating the total cardiac ventricular mass : right ventricular weight 10). According to previous results, PHC were considered when their CI value was above 25. Below that, animals were considered NPHC (10, 11). Considering that three groups were obtained, as follows: 1) PHC raised at 2638 masl. 2) NPHC maintained at 2638 masl. 3. NPHC located at 300 masl.

The apical part of the left lung from every bird was taken, was fixed in formalin (pH 7,34) and processed with a standard method of paraffin imbibition and H & E staining. Immunohistochemical procedures were carried out using a Super Sensitive®* Polymer-HRP Detection System® (Biogenex, Fremont, USA) for protein ET-1, dilution 1:250 (Mouse monoclonal anti-endothelin 1, Thermo scientific MA3-005®, USA). Routine recommended procedures for negative and positive controls were carried out.

Four chickens per group (PHC and NPHC) were chosen for quantitative evaluation of ET-1 protein expression, In the lung of each animal, 10 arterioles with 2 to 8 smooth muscle layers were studied under the light microscope. The Image pro-plus 7 software was employed as to calculate the smooth muscle layers number with or without ET-1 protein expression, and the total area, in square micrometers, occupied by the muscle layer as well as the area with positive immune staining in the muscle layer.

Experimental design. A completely randomized

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio y animales. Se utilizaron pollos de engorde, escogidos al azar, de la estirpe genética comercial Cobb 500, procedentes de la misma planta de incubación ubicada a 300 msnm. Las aves fueron divididas aleatoriamente en dos lotes así: lote 1 de 145 aves mantenidas bajo condiciones de hipoxia hipobárica a 2638 msnm (Bogotá, Colombia; Presión barométrica (PB): 560 mmHg; presión parcial de oxígeno (PO₂): 117 y lote 2 con 100 pollos bajo normoxia relativa a 300 msnm en una granja comercial (Nilo, Colombia; PB: 740 mmHg; PO₂: 155 mmHg. Todas las aves se mantuvieron bajo condiciones de salud y alimentación estándar y se controló la temperatura para evitar la obtención de lecturas por debajo de 20°C.

Toma y análisis de muestras. A las aves se les realizó la eutanasia a los 33 días de edad, mediante dislocación cervical, método aprobado y recomendado por el comité de ética institucional. La incidencia de HP se estableció mediante el cálculo del índice de masa cardiaca (IC), así: relación de los pesos de la masa cardiaca total y del ventrículo derecho (10). Según resultados anteriores los PHP tenían un IC superior a 25 y por debajo de este valor, los pollos se consideraron PNH (10,11).

Con base en lo anterior, se obtuvieron 3 grupos: PHP levantados a 2638 masnm. 2) PNH residentes a 2638 masnm. 3)PNH localizados a 300 masnm.

Se tomó el borde apical del pulmón derecho, se fijó en formalina (pH 7,34) y se procesó mediante un proceso estándar de imbibición en parafina y coloración con H & E. Posteriormente se realizaron pruebas de inmunohistoquímica (IHQ) por medio del Super Sensitive®* Polymer-HRP Detection System® (Biogenex, Fremont, USA) para la proteína ET-1, dilución 1:250 (Mouse monoclonal anti-endothelin 1, Thermo scientific MA3-005® USA). Se realizaron las pruebas de rutina para controles positivo y negativo de la prueba recomendados.

Para la evaluación cuantitativa de la expresión de la proteína ET-1 en las arteriolas pulmonares, se escogieron cuatro pollos por grupo experimental y en cada uno se realizó análisis morfométrico de 10 arteriolas que contenían en su capa media muscular entre 2 y 8 capas celulares de músculo liso con el microscopio óptico. El programa Image-Pro Plus versión 7 donde se evaluó el número de capas musculares, el de células musculares y el de células musculares con marcación positiva a la IHQ ET-1; asimismo el área total de la túnica muscular y el área de

model was used, and expected homogeneity of experimental material was fulfilled. The experimental error was a random independent variable with a normal distribution, zero median and variances homogeneity. When the latter was not found, corrective procedures were employed: the Welch's and Scheffe's tests. Likewise, Pearson correlative tests as to establish the possible association among quantitative values (12). To declare statistical differences, significance level had to be $p < 0.01$. Data analysis was brought about with IBM® SPSS® predictive analytics software and solutions, version 17.

RESULTS

In the hypoxia exposed chickens 53% of them developed PH, and no cases of the disease were registered in the group of broilers resident in a relative normoxic environment.

Engrossment of the middle muscle layer in pulmonary arterioles (results not shown) of PHC. ET-1 expression was encountered in the endothelium, muscle cells and adventitia of blood vessels (Figure 1). Percentage of both, positive cells and area of the middle muscular layer showing expression of ET-1 was higher in animals resident at high altitude than in those placed at 300 masl ($p < 0.001$; Figure 2). A direct association of the 2 abovementioned variables was found ($r = 0.954$; $p < 0.000$).

In figure 3 are the values obtained for ET-1

marcación positiva.

Una vez se tomaron las fotografías se analizaron las imágenes con el programa Image-Pro Plus® y se dejó únicamente su túnica muscular para las mediciones correspondientes. Se tomaron 2 variables de medición; en la primera, se contó el número total de núcleos para predecir el total de células musculares lisas y se determinó cuántas de ellas tenían algún grado de marcación y de esta manera se obtuvo la variable porcentaje de células musculares lisas positivas a la IHQ de ET-1; para la segunda variable se determinó el área total de la túnica muscular en micrómetros cuadrados, luego, el área de coloración (IHQ positiva a ET-1) y de esta forma, se obtuvo el área de marcación positiva a la IHQ de ET-1 sobre un área fija de referencia de 100 micrómetros cuadrados o el porcentaje de área de la túnica muscular con marcación positiva a la IHQ de ET-1.

Diseño experimental. se realizó mediante un modelo completamente al azar y se demostró que se cumplieron con los supuestos de homogeneidad del material experimental, también que el error experimental es una variable aleatoria independiente con distribución normal, media cero y homogeneidad de varianzas; cuando no se cumplió la homogeneidad de varianzas se realizó ANOVA con la prueba de Welch, o de Scheffe. Igualmente se llevaron a cabo pruebas de correlación de Pearson para ver el grado de asociación entre las variables cuantitativas (12).

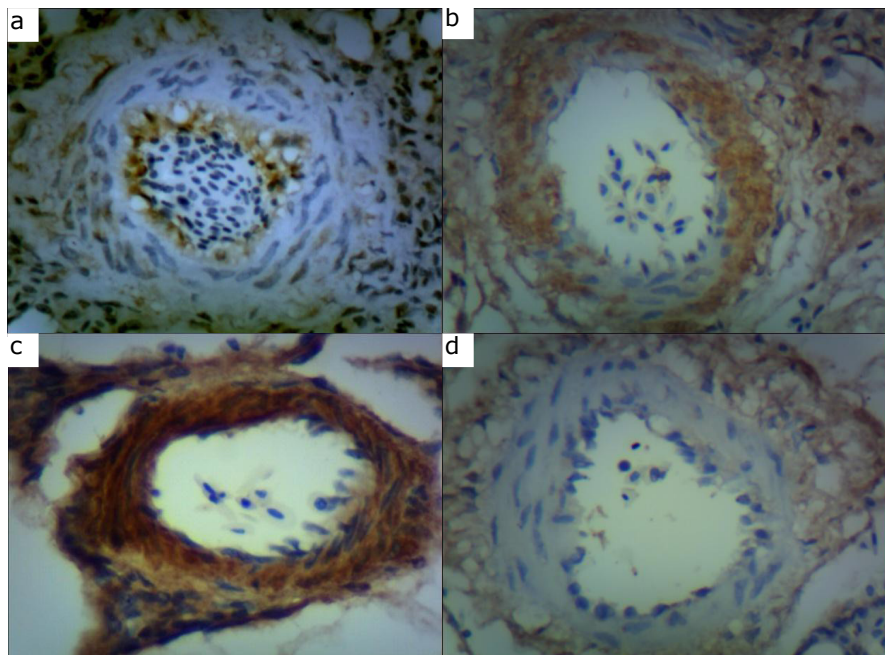


Figure 1. a: ET-1 protein expression in pulmonary arterioles of a chicken: a, maintained under relative normoxia, b: exposed to hypobaric hypoxia (non-pulmonary hypertensive), c: pulmonary hypertensive, d: maintained under hypobaric hypoxia (non-pulmonary hypertensive).

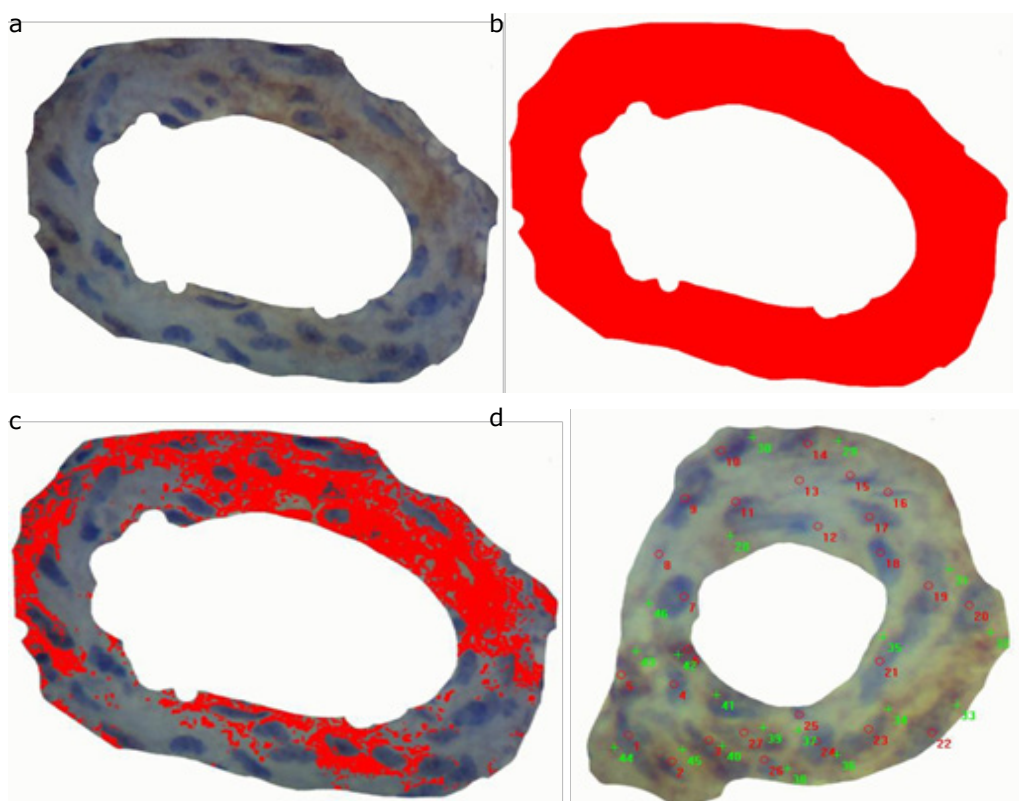


Figure 2. a, Image obtained of the middle muscle layer of an arteriole, before ET-1 expression measurements; b, image obtained of the area occupied by the middle muscle layer of an arteriole; c, results of the area (μm^2) obtained after measurement; d, results obtained after counting of cells immunohistochemically expressing ET-1 protein

expression, which was higher in PHC placed at high altitude than in NPHC maintained at the same sea level. The latter showed higher expression than those maintained at 300 masl ($p < 0.001$). PHC values of ET-1 showed a direct association with CI ($r = 0.83$; $p < 0.001$).

DISCUSSION

The present work corroborates the high mortality rates previously reported for the same strain of chickens under similar environmental conditions (3,11,13). It is clear that given that temperature was controlled, PH cannot be attributed to low temperature in the present study (14,15).

Hypoxia stimulates endothelial function. In susceptible individuals, augmentation of pulmonary arterial pressure results in PH and ET-1 secretion above the upper physiological limits. ET-1 migrates to muscle cells, where it enhances Ca^{2+} -calmodulin way and protein kinases; muscle contraction ensues and the remodeling process takes place due to a complex molecular framework (16,17). Although the mechanism of action of ET-1 in the pulmonary

Para declarar diferencias estadísticas, el nivel de significancia tuvo que ser $p < 0.01$. El análisis de los datos se hizo con el IBM® SPSS® predictive analytics software and solutions, versión 17.

RESULTADOS

En el grupo de pollos expuestos a hipoxia hipobárica, el 53% de los animales desarrollaron HAP y en el lote en normoxia relativa, 0%.

Hubo engrosamiento de la túnica media muscular de las arterias pulmonares (no se muestran los resultados), en el análisis morfométrico de la expresión de la proteína ET-1 mediante inmunohistoquímica se encontró marcación positiva en el endotelio, en las células musculares lisas y en la adventicia de arterias y arteriolas pulmonares (Figura 1); al comparar las mediciones de las variables porcentaje de células positivas a la IHQ de ET-1 y del porcentaje de área de la túnica muscular con marcación positiva se encontró mayor expresión de la ET-1 en las células musculares lisas de arterias pulmonares en los pollos residentes en la altura, comparados con los ubicados a 300 msnm ($p < 0.001$; Figura

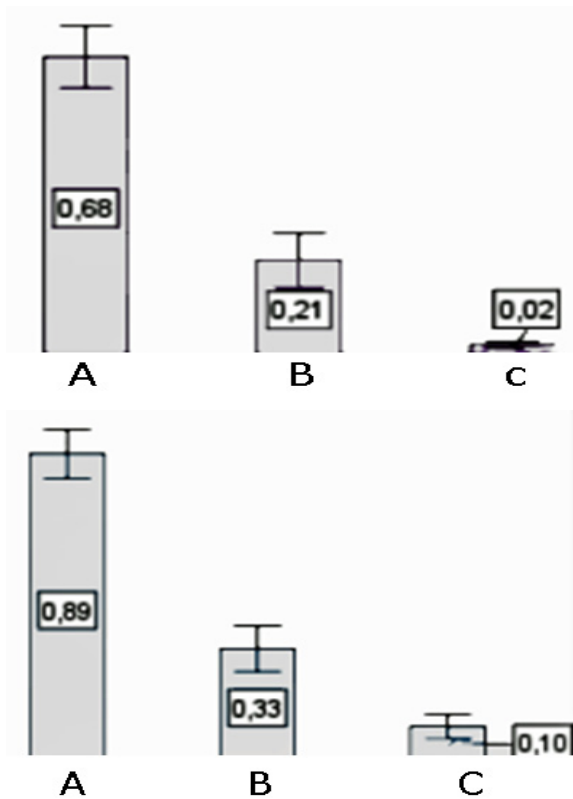


Figure 3. Percentage of the number cells expressing ET-1 protein (left side bars), and area (right side bars) occupied by them in the middle muscle layer of arterioles in: A, pulmonary hypertensive birds (subjected to hypoxia), B, non-pulmonary hypertensive birds subjected to hypoxia, and C, non-pulmonary hypertensive birds not subjected to hypoxia.

vessels is controversial, there is evidence that this mechanism has enough evidential support

Similar findings were reported in human pulmonary arteries of pulmonary hypertensive individuals (18).

Present results complement a previous study in which mRNA of ET-1 expression was higher in PHC than in NPHC (9,19).

The high correlation between ET-1 protein expression and CI, once more reinforces the idea that ET-1 is a fundamental molecule in the pathogenesis of PH, given its potent vasoconstrictor effect.

Several molecules, among others, have been studied as implicated in PH pathogenesis. Thus, serotonin (20), ETA and ETB (ET-1 receptors; 9,19,21), nitric oxide synthase (22-24), connective tissue growth factor and adrenomedullin (19). Given that studied molecules as key factors in

2). Se encontró asociación directa entre las 2 variables mencionadas ($r=0.954$; $p<0.000$).

En la figura 3 aparecen los valores obtenidos para la expresión de ET-1, la cual fue mayor en los PHP que en los sanos de la altitud; a su vez, estos últimos tuvieron una mayor expresión de la proteína ET-1 que los pollos criados a 300 msnm. Los valores de la expresión de la proteína ET-1 de los PHP tuvieron asociación directa con los valores del IC ($r=0.83$; $p<0.001$).

DISCUSIÓN

El presente trabajo corrobora las altas tasas de mortalidad reportadas con antelación para la misma estirpe de pollos, en condiciones ambientales comparables (3,11,13). Es claro que dado que la temperatura se controló en el presente trabajo, la ocurrencia de HP no se puede atribuir a la salida de baja temperatura (14,15).

La hipoxia estimula la función endotelial. En individuos susceptibles, el aumento de la presión arterial resulta en HP y secreción de ET-1 por encima de límites fisiológicos. La ET-1 migra a las células musculares y allí estimula la vía de Calcio calmodulina y de las proteínas cinasas; se inicia la contracción muscular y el proceso de remodelación vascular en virtud de una compleja interacción molecular (16,17). Aunque el mecanismo de acción de la ET-1 en los vasos pulmonares ha sido controvertido, hay soporte con relación a su validez.

En la hipertensión pulmonar de los humanos, se reportaron hallazgos similares (18).

El presente trabajo complementa un estudio anterior en el cual se reportaron mayores niveles de expresión del mRNA de ET-1 en PHP que en sanos (9,19).

La alta correlación encontrada entre la expresión de la proteína de la ET-1 y el IC refuerza aún más la idea de que la ET-1 es una molécula fundamental en la patogénesis de la HP, en virtud de su potente efecto vasoconstrictor.

Varias moléculas, entre otras, se han estudiado como implicadas en la patogénesis de la HP. Así, la serotonina (20), los receptores ETA y ETB de la ET-1 (9,19,21), la sintasa de óxido nítrico (22-24), el factor de crecimiento del tejido conectivo y la adrenomedulina (19). Dado que las moléculas estudiadas son factores clave en la patogénesis ya sea como vasoconstrictores o vasodilatadores de los vasos pulmonares, ellos deben actuar en armonía en condiciones fisiológicas y cualquier

PH pathogenesis are either vasoconstrictors or vasodilators of the pulmonary vasculature, they should be acting in harmony under physiological conditions and any disruption in their balance should result in the development of PH, as presently demonstrated although solely referred to ET-1 protein expression. It should be taken into account that alternative mechanism might exist for the development of PH which have been proposed, although are not to be brought into discussion at present.

The ET-1 receptors expression in the muscle layer of arterioles reinforced the involvement of ET-1 in the pathogenesis of PH (25,26)

The quantitative and immunohistochemical comparative findings of the present work appear to be the first ones in PHC and NPHC broilers maintained under controlled temperature conditions and subjected to natural conditions of hypobaric hypoxia and relative normoxia.

Acknowledgments

Financial support was granted by División de Investigaciones de la sede Bogotá and Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia. We are indebted to the members of the Histotechnological laboratory in the National University, Bogotá.

desbalance debe resultar en el desarrollo de HP, como se demostró en este estudio, aunque referido solamente a la expresión de la proteína de la ET-1. Debe tenerse en cuenta que hay mecanismos alternativos en el desarrollo de HP que se han propuesto, aunque ellos no se consideran en esta discusión.

La expresión de los receptores de ET-1 en la túnica muscular de las arteriolas, sustenta la idea de la participación de la ET-1 en la patogénesis de la HP (25,26).

Los estudios comparativos de índole cuantitativa e inmunohistoquímica presentados, aparecen como los primeros ejecutados en PHP y NHP mantenidos bajo condiciones naturales de hipoxia hipobárica y normoxia relativa y con un control de la temperatura ambiental.

Agradecimientos

El presente estudio fue financiado por la División de Investigaciones de la sede Bogotá y por la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia. Se agradece al personal del Laboratorio de Histotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, por su apoyo en la implementación de las pruebas de inmunohistoquímica.

REFERENCES

- Hernández A. Influencia de la altitud, el sexo, la raza y el nivel energético de la ración en la incidencia de la ascitis de origen hipóxico en pollos de engorde. *Rev Fac Med Vet Zoot* 1982; 35:1-6.
- Guzmán, L. *Efectos de la edad, el peso del huevo y estatus tiroideo materno sobre niveles de hormonas tiroideas, índice cardiaco y crecimiento pre y post eclosión en pollos de engorde sometidos a dos regímenes de alimentación y dos alturas sobre el nivel del mar*. [Tesis Doctoral]. Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2005.
- Monroy LC, Hernández A. Susceptibilidad a la hipoxia hipobárica en una estirpe comercial de pollos de engorde. *Rev Fac Med Vet Zoot* 2013; 60(2): 86-99.
- Veith C, Schermuly RT, Brandes RP, Weissmann N. Molecular mechanisms of hypoxia-induced factor-induced pulmonary arterial smooth muscle cell alterations in pulmonary hypertension. *J Physiol* 2016; 594(5):1167-77.
- Wideman RF, Rhoads DD, GF, Anthony NB. Pulmonary arterial hypertension (ascites syndrome) in broilers: A review. *Poult Sci* 2013; 92:64-83.
- Mathew R. Pulmonary Hypertension: Endothelial Cell Function. Chapter 1. In: *Pulmonary Hypertension - From Bench Research to Clinical Challenges*, Dr. Roxana Sulica (Ed.), 2011. InTech, DOI: 10.5772/26198. <http://www.intechopen.com/books/pulmonary-hypertension-from-bench-research-to-clinical-challenges/pulmonary-hypertension-endothelial-cell-function>

7. Fraidenburg D, Yuan J. Current and future therapeutic targets for pulmonary arterial hypertension. *High Al Med Biol* 2013; 14(2):134-143.
8. Hamidi SA, Kin RZ, Szema AM, Lyubsky S, Jiang YP, Said SI. VIP and endothelin receptor antagonist: An effective combination against experimental pulmonary arterial hypertension. *Respir Res* 2011; 12:141-148.
9. Gómez A. P., Moreno M. J., Baldrich R. M., Hernández A. Endothelin-1 Molecular Ribonucleic Acid Expression in Pulmonary Hypertensive and Nonhypertensive Chickens. *Poult Sci* 2008; 87:1395-1401.
10. Alexander AF, Jensen R. Gross cardiac changes in cattle with high mountain disease and in experimental cattle maintained at high altitudes; *Am J Vet Res* 1959; 20:680-689.
11. Areiza RA, Rivas PC, Hernández A. A Quantitative Study of the Pulmonary Vascular Bed and Pulmonary Weight: Body Weight Ratio in Chickens Exposed to Relative Normoxia and Chronic Hypobaric Hypoxia. *J Poult sci* 2011; 48(4):267-274.
12. Kutner, Michael H., Christopher J. Nachtsheim, John Neter and William Li. *Applied linear statistical models*. 5th ed. Boston: McGraw-Hill; 2005.
13. Vásquez IC, Hernández, A. Hipertensión pulmonar en pollos, lapso de exposición a la hipoxia hipobárica y relación peso pulmonar: peso corporal, bajo condiciones de temperatura. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2012; 25(1): 81-89.
14. Pakdel A., Van Arendonk JAM, Vereijken ALJ, Bovenhuis H. Genetic Parameters of Ascites-Related Traits in Broilers: Effect of Cold and Normal Temperature Conditions. *Br Poult Sci* 2005; 46(1):35-42.
15. Pan JQ, Tan X, Li JC, Sun WD, Wang XL. Effects of early feed restriction and cold temperature on lipid peroxidation, pulmonary vascular remodelling and ascites morbidity in broilers under normal and cold temperature. *British Poult Sci* 2005; 46(3):374-381.
16. Budhiraja R, Tuder RM, Hassoun PM. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation* 2004; 109(2):159-165.
17. Hernández, A, Sandino de M. Pulmonary Hypertension in the Chicken Model. Chapter 6. In: *Pulmonary Hypertension - From Bench Research to Clinical Challenges*, Dr. Roxana Sulica (Ed.), 2011. InTech, DOI: 10.5772/26198. <http://www.intechopen.com/books/pulmonary-hypertension-from-bench-research-to-clinical-challenges/pulmonary-hypertension-endothelial-cell-function>
18. Giaid A, Yanagisawa M, Langkeben D, Michel R, Levy R, Shenib H, Kimura S, et al. Expression of endothelin 1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1993; 328:1732-1739.
19. Gómez AP, Moreno MJ, Iglesias A, Coral PX, Hernández A. Endothelin 1, its endothelin Type A Receptor, Connective Tissue Growth Factor, Platelet-Derived Growth Factor, and Adrenomedullin Expression in Lungs of Pulmonary Hypertensive and Nonhypertensive Chickens. *Poult Sci* 2007; 86(5):909-916.
20. Li Y, Zeng J, Tang Z, Li Y, Guo J, Pan J. 5-Hydroxytryptamine levels in the pulmonary arterioles of broilers with induced pulmonary hypertension and its relationship to pulmonary vascular remodelling. *Avian pathol* 2013; 42(4):335-341.
21. Balyakina EV, Chen D, Lawrence ML, Manning S, Parker RE, Shappell SB, Meyrick B. ET-1 receptor expression and distribution in L1 and L2 cells from hypertensive sheep pulmonary artery. *Am J Physiol Cell Mol Physiol* 2002; 283(1):L42-51.
22. Stenmark KR, Mecham RP. Cellular and Molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling. *Annu Rev Physiol* 1997; 59:89-144.
23. Moreno M, Hernández A, Nitric Oxide Synthase Expression in the Endothelium of Pulmonary Arterioles in Normal and Pulmonary Hypertensive Chickens Subjected to Chronic Hypobaric Hypoxia. *Avian Diseases* 2003; 47(4):1291-1297.
24. Moreno M, Hernández A. Pulmonary arterioles remodelling in hypoxic broilers, expressing different amounts of endothelial nitric oxide synthase. *Poult Sci* 2006; 85:899-901.
25. Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyasaki H, Kimura S, Goto H, et al. Cloning of cDNA encoding a nonisopeptide-selective subtype of endothelin receptor. *Nature* 1990; 348:732-735.