

ÁREA CAPILAR SUBEPITELIAL EN EL ENDOMETRIO OVINO EN LOS DÍAS 0 Y 14 DEL CICLO ESTRAL Y EN LOS 14, 20 y 24 DÍAS DE GESTACIÓN

Subepithelial Capillary Area in the Ovine Endometrium at 0 and 14 Days of the Estrous Cycle and 14, 20 and 24 Days of Gestation

▪ **Jorge A. Sánchez¹, José M. Rodríguez-Márquez² y Aureliano Hernández³**

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia. ²Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, Apartado 15252. Maracaibo 4005-A, Edo. Zulia, Venezuela. E-mail: jmrodrim@telcel.net.ve

³Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia. Santafé de Bogotá, Colombia.

RESUMEN

Para analizar posibles cambios en el área capilar subepitelial del endometrio (ACS) a los 0 y 14 días (d) del ciclo estral y a los 14, 20 y 24 d de gestación en la oveja, se utilizaron 8 cortes uterinos coloreados con H&E, representativos de cada útero de 10 ovejas distribuidas equitativamente en 5 grupos, para cada uno de los días mencionados. Se utilizó un analizador de imágenes computarizado, calculando el ACS, como porcentaje de un área de referencia. Para el ciclo estral, el mayor ACS encontrado fue el de la zona caruncular al d 14 y el menor en la intercaruncular en el d 0; hubo diferencias entre los valores de ACS obtenidos para las zonas en los dos días estudiados ($P<0,01$). En el d 14 de gestación, se detectaron diferencias significativas entre las zonas, siendo el mayor valor promedio para la zona caruncular que para la intercaruncular. En los d 20 y 24 de gestación, hubo diferencias entre los valores de ACS en regiones adyacentes al embrión versus las alejadas del mismo; igualmente entre las zonas carunculares a los 20 d. A los 24 d, para la zona intercaruncular solamente ($P<0,01$). El trofoblasto, en las regiones cercanas al embrión, parece inducir el aumento de ACS, lo cual se hace evidente a los 20 y 24 d de la gestación. A los 14 d del ciclo, hay un mayor valor de ACS en el endometrio que en el d 0, sin que se pueda ofrecer una explicación satisfactoria para este hallazgo. La influencia del embrión en la angiogénesis nos podría indicar que fallas embrionarias en dicha estimulación ocasionaría la muerte del embrión producto de una disminución en el suministro de gases y nutrientes hacia el

mismo, frente a un conceptus cuyas demandas metabólicas incrementan con la edad de gestación.

Palabras clave: Oveja, implantación, trofoblasto, área capilar subepitelial, endometrio.

ABSTRACT

To analyze possible changes in capillary subepithelial area of the endometrium, at 0 and 14 days of the estrous cycle and at 14, 20 and 24 days of gestation, 8 ewes were studied, using representative sections of the uterus of each animal colored with H&E. A computerized image analyzer was employed to calculate SCA (subepithelial capillary area), as a percentage of a reference standard area. The mean value for ACS was higher at 14 (caruncular zone) than at day 0 of the estrous cycle; the lowest value was seen in the intercaruncular zone at day 0. Values obtained for caruncular and intercaruncular zones were different at the 2 ages studied ($P<0.01$). At 14 days of gestation, there were differences between uterine zones, with higher SCA in the caruncular one. At 20 and 24 days of gestation, differences were detected between regions located near the embryo in comparison to more distant ones. Differences were also found between caruncular zones at 20 days, and at 24 for the intercaruncular ones ($P<0.01$). The trophoblast surrounding the embryonic area, appears to induce angiogenesis in the endometrial subepithelium. The differences observed during the estrous cycle, can not be explained at present. The influence of the embryo in the vasculogenesis could indicate that fail embryonic in this stimulation it would cause the death of the embryo product of a decrease in the supply of gases and nutritious toward the same one, in front of

a conceptus whose metabolic demands increase with the gestation age.

Key words: Sheep, implantation, trophoblast, capillary subepithelial area, endometrium.

INTRODUCCIÓN

La supervivencia del embrión depende del status fisiológico de la madre y en particular de la secreción de moléculas clave para el establecimiento de la placenta y el crecimiento del embrión y posteriormente del feto. Esto a su vez depende del crecimiento que debe darse en el endometrio, en especial, de las glándulas en regiones intercarunculares del útero y de la angiogénesis.

Durante los catorce primeros días (d) del desarrollo, no hay evidencias histológicas de interacción entre el trofoblasto y el epitelio uterino como indicativo de que la placentación se ha iniciado. Así, hasta los 14 d de gestación, el trofoblasto de todo el concepto es un epitelio cúbico simple; a partir de este día el tejido se desarrolla, constituyéndose en un epitelio compuesto por 2 a 3 capas de células cuboidales o cilíndricas, con células binucleadas y cristaloides intracitoplasmáticos en las células uninucleadas. Esta transformación del epitelio, ocurre inicialmente cerca al embrión extendiéndose de manera gradual hacia las zonas periféricas del conceptus. Concomitantemente con este proceso, cuando el trofoblasto desarrollado contacta el epitelio de revestimiento uterino, conduce a disminuir la altura de las células del epitelio uterino. En efecto, el epitelio pasa de ser cilíndrico simple o pseudoestratificado a un tejido plano o cuboidal simple, con sincitios [10, 13]. Las transformaciones descritas, tanto a nivel trofoblástico como del epitelio uterino, han ocupado la mayor parte del saco alantocoriónico a los 24 d de gestación, en preñeces simples [10].

Por otro lado, la angiogénesis que se lleva a cabo en el mesodermo esplácnico de la alantoides, debe completarse en alguna etapa de la gestación, al punto de posibilitar el intercambio gaseoso propio de la respiración embrionaria (o fetal), en armonía con el desarrollo de los *placentomus* y de un desarrollo significativo de los vasos capilares del subepitelio del útero. De la misma manera, aún cuando en los últimos años se han esclarecido algunos mecanismos inherentes a la vasculogénesis y angiogénesis en diversos sistemas orgánicos, no está claro, cuándo actúan, ni cuáles son los procesos responsables de la angiogénesis en el útero de la oveja durante la gestación, revisado por Torry y Torry [21]. Muchas citoquinas han mostrado gobernar el crecimiento, las funciones y migración del trofoblasto, especulándose sobre un número diferente de citoquinas, *metabolitos* y factores mecánicos, capaces de promover o inhibir la angiogénesis, revisado por Torry y Torry [21], muchos de los cuales están presente en el endometrio, teniéndose claro que un solo factor es improbable que sea el único iniciador del crecimiento vascular a nivel de endo-

metrio y placenta [21], sino, que este es un proceso complejo estrechamente regulado, donde inductores angiogénicos extracelulares estimulan la migración de células endoteliales, mientras reguladores negativos contrarrestan este efecto. Cambios en un balance relativo de inhibidores e inductores activan el "switch angiogénico", antes de estabilizar las moléculas que activan la maduración de vasos sanguíneos nacientes [2].

Dentro de las citoquinas consideradas estar involucradas en el desarrollo vascular del tejido placental (materno y fetal) están los factores de crecimiento fibroblásticos (FGFs), quienes estimulados por las células endoteliales, pueden ser el "switch" entre el crecimiento, la diferenciación y la involución durante la angiogénesis por alteración de la adhesividad o integración mecánica de su matriz extracelular, revisado por Dantzer y Leiser [5]. Los factores de crecimiento transformantes *beta* estimulan la angiogénesis [18] y contribuyen al establecimiento de la placenta viable por su expresión en trofoblasto y células del sincitio trofoblasto, en el ovino están involucrados en la formación de la porción fetal de la placenta [8]. El Factor de Necrosis Tumoral es otro factor polipéptidico que regula la expresión de varios genes en las células endoteliales e induce la angiogénesis en diferentes tejidos mediante una vía controlada por mecanismos paracrinos y/o autocrinos, mediados por la acción de IL-8 y el Factor de Crecimiento Fibroblástico básico [24].

Una de las citoquinas mayormente involucrada en el establecimiento de la vasculatura placental es el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) [21]. Se ha detectado en cotiledón, corion y amnios sugiriendo que el VEGF puede jugar un papel en la inducción de la angiogénesis y promoción de la permeabilidad en los microvasos que perfunden las membranas placental materna y fetal en la oveja [21]. El VEGF es una citoquina multifuncional que juega un papel primordial mediando la neovascularización así como otras alteraciones de las células endoteliales durante la inflamación y es producido por los neutrófilos [20]. Partiendo de lo anterior y del hecho que la respuesta uterina a la implantación del blastocisto guardan ciertas similitudes con las reacciones inflamatorias clásicas, este sería otro mecanismo mediante el cual se estimula la secreción del VEGF por parte de los neutrófilos para dar inicio a la neovascularización placental.

Bajo condiciones hipoxicas también el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas y el Factor de Crecimiento Placenta (PLGF), operan como factores de crecimiento vascular [12]. Este último es otro factor considerado que está involucrado en la vascularización placental, el cual es una proteína homóloga al VEGF [7].

En trabajos previos, se observó que la angiogénesis del alantocorion se inicia cerca del embrión [13], lo cual, aunado a los hallazgos atinentes al mayor avance comparativo de la implantación en las zonas cercanas al embrión, permite plantear la posibilidad de que el embrión pueda estar jugando un papel importante en el desarrollo de neovascularizaciones en el útero.

Se ha encontrado en el útero bovino que existe una mayor densidad capilar en las zonas coincidentes con las áreas preferenciales de ubicación del embrión, esto es, en la mitad posterior del cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo [4, 6, 22]. Dichos hallazgos llevan a pensar la posibilidad de que el *conceptus* esté modulando la angiogénesis en el endometrio.

El presente trabajo se diseñó con el objeto de analizar posibles cambios en el área capilar subepitelial del útero durante el lapso transcurrido entre los 14 y 24 d de la gestación en la oveja y si esos cambios, por lo menos de manera parcial, son atribuidos a la presencia del embrión. El establecimiento de los cambios morfológicos (densidad vascular) subepiteliales a nivel endometrial y, la implicación del *conceptus* en estimular dichos cambios, demostrarían la gran responsabilidad del éste en asegurar su supervivencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 10 ovejas criollas de 15 meses de edad, sanas desde el punto de vista clínico, las cuales fueron mantenidas en óptimas condiciones de salud y nutrición, siendo alimentadas con pasto kikuyo (cortado y en pastoreo) y alimento concentrado comercial (250 g/animal/día), sal mineralizada para ovinos en reproducción y agua a voluntad.

Antes de obtener las muestras, a los animales se les hizo seguimiento de dos ciclos estrales (CE) consecutivos, observando las ovejas todos los días, con la ayuda de un carnero caudoepidectomizado equipado con un chaleco marcador para la detección del estro, en adición al perfil de los niveles séricos de progesterona mediante el método de radioinmunoanálisis en fase sólida (Diagnostic products Co, Los Angeles, California, USA), usando muestras obtenidas día intermedio durante todo el CE.

Los animales fueron divididos al azar en 5 grupos (2 animales/grupo) así: 0 y 14 d del CE y, 14, 20 y 24 d de la gestación (gestaciones simples, esto es, con un solo embrión en el útero). Para el caso de los animales gestantes, se permitió la monta directa por un macho entero. El diagnóstico de la gestación fue hecho con base en los niveles séricos de progesterona, por laparotomía exploratoria para el d 14 y para los 20 y 24 d de la gestación, mediante el uso de un ecógrafo (Aloka, modelo ssd-210DXII, con transductor de 5 MHz).

Una vez obtenido el tracto reproductivo, se efectuó la fijación por perfusión a presión constante con una solución de glutaraldehído al 3%, de pH 7, a través de las arterias uterina media y vaginal.

Un total de 8 cortes por cada útero fueron realizados, cuatro en cada cuerno (dos de la región caruncular y dos de la intercaruncular), uno en la parte anterior del mismo y otro en la mitad posterior. Para los casos de 20 y 24 d, se obtuvo un corte adicional, cerca del embrión, cuando el corte correspondiente al cuerno preñado, no coincidía con el de la ubicación del

embrión. Secciones de 5 micrómetros de grosor fueron hechos y coloreados con Hematoxilina y Eosina, según un procedimiento estándar [15].

Para el análisis morfométrico, se empleó un analizador de imágenes computarizado (Leco 2001, CANADÁ), conectado a un microscopio óptico a través de una cámara de vídeo.

El área ocupada por el lumen de los capilares subepiteliales del endometrio (ACS), en cada micropreparado fue calculada así: cada medición se hizo en un área de referencia de 9mm^2 (la ocupada por el monitor de imágenes con un objetivo de 10X en el microscopio), utilizando la configuración binaria del analizador, expresándose el resultado como el porcentaje del área de referencia.

Los estudios estadísticos, incluyeron un diseño completamente al azar con arreglo factorial, utilizando un paquete estadístico computarizado [19].

RESULTADOS

En los valores obtenidos de ACS, no hubo diferencias entre animales de cada grupo, en ningún d del CE ni a los 14 d de gestación, por lo cual los datos son presentados para cada grupo de manera común.

El mayor valor del ACS correspondió a la zona caruncular al d 14 del CE y el menor en la intercaruncular el día 0 del CE. Hubo diferencias significativas entre los días y las zonas sólo el d 0 ($P < 0,01$), TABLA I.

En el d 14 de gestación, hubo diferencias significativas entre las zonas, siendo el mayor valor promedio para ACS en la zona caruncular, en comparación con la intercaruncular ($P < 0,01$), TABLA II.

Los datos analizados para los 20 y 24 d de gestación, mostraron que hubo diferencias significativas al considerar las dos zonas estudiadas ($P < 0,01$), TABLA III. Al establecer comparaciones entre regiones adyacentes al embrión, versus las alejadas del mismo, se encontró que había diferencias entre las zonas carunculares de las regiones consideradas a los 20 y, a los 24 d para la zona intercaruncular solamente ($P < 0,01$), TABLA III y IV.

DISCUSIÓN

A partir de los resultados obtenidos, puede plantearse que la influencia estrogénica y/o progestacional, modula(n) de alguna forma la angiogénesis de los capilares subepiteliales del endometrio en la oveja, durante el CE y a los 14 d de gestación. Sin embargo, debe anotarse que después de este último día, con el comienzo del desarrollo trofoblástico, verbigracia entre los 15 y 20 d de la gestación podría iniciarse un fenómeno angiogénico en el subepitelio uterino que resulta en el aumento del ACS, evidente al comparar los resultados del

TABLA I
VALORES PROMEDIO DEL **ÁREA** CAPILAR
SUBEPITELIAL (ACS) EN EL **ENDOMETRIO OVINO**
EN LOS **DÍAS 0 Y 14** DEL CICLO ESTRAL ($\bar{X} \pm EE$)

Días del ciclo	Zona Uterina	
	Caruncular	Intercaruncular
0	10,94 ± 1,1^a	7,43 ± 0,48 ^b
14	13,27 ± 1,2 ^c	12,39 ± 0,85 ^c

Las letras disimiles, denotan diferencias (P<0,01). \bar{X} = promedio.
EE = error estándar.

TABLA II
VALORES PROMEDIO DEL **ÁREA** CAPILAR
SUBEPITELIAL (ACS) EN EL ENDOMETRIO DE OVEJAS
EL **DÍA 14** DE LA **GESTACIÓN** ($\bar{X} \pm EE$)

Días de gestación	Zona Uterina	
	Caruncular	Intercaruncular
14	11,20 ± 2,0 ^a	8,86 ± 1,1 ^b

Las letras disimiles, denotan diferencias (P < 0.01). \bar{X} = promedio.
EE = error estándar.

TABLA III
VALORES PROMEDIO DE **ÁREA** CAPILAR SUBEPITELIAL
(ACS) EN EL ENDOMETRIO DE OVEJAS,
AL **DÍA 20** DE LA **GESTACIÓN** ($\bar{X} \pm EE$)

Días de gestación y zona uterina	Distancia al Embrión	
	Adyacente	Alejada
20 Caruncular	15,99 ± 2,1 ^a	9,16 ± 1,8 ^b
20 Intercaruncular	13,88 ± 1,5 ^c	15,90 ± 3,0 ^c

Las letras disimiles, denotan diferencias (P < 0,01). \bar{X} = promedio.
EE = error estándar.

TABLA IV
VALORES PROMEDIO DE **ÁREA** CAPILAR SUBEPITELIAL
(ACS) EN EL ENDOMETRIO DE OVEJAS,
AL **DÍA 24** DE LA **GESTACIÓN** ($\bar{X} \pm EE$)

Días de gestación y zona uterina	Distancia al Embrión	
	Adyacente	Alejada
24 Caruncular	16,00 ± 3,2 ^a	14,80 ± 2,5 ^a
24 Intercaruncular	35,00 ± 3,9 ^b	19,90 ± 3,0 ^c

Las letras disimiles, denotan diferencias (P < 0.01). \bar{X} = promedio.
EE = error estándar.

d 20 de gestación, con los del CE y los correspondientes al d 14 de la gestación. Con base en lo anterior, podría postularse que la presencia del embrión tiene injerencia en el proceso de vascularización mencionado, suponiendo que las secreciones del conceptus en las regiones que rodean el embrión, inducen la formación de un mayor número de vasos capilares en el subepitelio del endometrio, en comparación con lo que sucede en regiones más alejadas. A los 20 d de gestación, hay mayor

desarrollo trofoblástico en regiones adyacentes al embrión que en las más distantes [10]. Lo que podría explicar un mayor efecto angiogénico por parte del trofoblasto desarrollado en comparación con el no desarrollado, en el caso de necesitarse un trofoblasto desarrollado para la producción de factores angiogénicos.

El trofoblasto produce el VEGF [21], lo que podría explicar en parte lo encontrado en el presente estudio. El VEGF también es producido en el útero y depende de la secreción de estrógenos como fue demostrado en ovejas ovariectomizadas [17]. Ello no concuerda con lo encontrado en el presente trabajo en las ovejas del d 0 del CE, pero podría implicar que cerca al embrión, hay mayor producción de estrógenos por parte del trofoblasto. Sin embargo, no se debe descartar que la progesterona puede tener una acción angiogénica durante la implantación, explicándose así los resultados del presente estudio, a los 20 y 24 d de la gestación. Esto se apoya en los resultados de Ni y col. [16], quienes hallaron un aumento en la expresión del VEGF durante la preñez en la rata, junto con el del flujo sanguíneo y la disminución en la resistencia vascular en el útero, con el avance de la gestación. En el mismo contexto, Ghosh y col. [11], comprobaron que al inhibir la secreción de progesterona, hay una reducción en la secreción de citoquinas necesarias para la implantación y la angiogénesis. Así mismo, Jojovic y col. [14], encontraron una acción confluyente entre el VEGF, el factor epidermal de crecimiento y la progesterona en el desarrollo de la placenta en la rata. Carmeliet y col. [3], resaltan la importancia de la angiogénesis en la supervivencia embrionaria, mediante la identificación de un determinante letal, el cual es la ausencia de un alelo individual para la expresión de VEGF en el embrión. Es claro entonces, que se necesita un desarrollo vascular adecuado en los dos componentes placentarios para garantizar la supervivencia del embrión.

Otra molécula que puede jugar un papel importante en la remodelación y angiogénesis endometrial en ovinos, es el factor transformante de crecimiento [9]. Así mismo, Watanabe y col. [23], estudiaron la expresión de VEGF durante el CE y la preñez en la rata, encontrando que en los compartimientos fetales (verbigracia amnios, células del saco vitelino) había mayor cantidad de VEGF en comparación con otras áreas, hecho que estaría explicando el hallazgo del presente trabajo relacionado con una mayor vascularización del endometrio en las regiones aledañas al embrión, a través de un efecto paracrino.

Es interesante anotar que Athanassiades y col. [1], encontraron que el VEGF es importante para la proliferación celular en el trofoblasto humano; de ocurrir así en la oveja, daría un soporte a hallazgos previos [10] y los del presente estudio, por cuanto para que haya un mayor desarrollo trofoblástico, es necesario que ocurra **hiperplasia, verbigracia** entre los 14 y 20 d de la gestación. Como el desarrollo trofoblástico es mayor cerca al embrión, ello implicaría una producción comparativamente aumentada de factores angiogénicos y **mitóticos** en el wrion, los cuales, entonces, estarían cumpliendo un doble propósito:

estimular el desarrollo del trofoblasto e incrementar la angiogénesis en el útero. Actualmente se llevan a cabo estudios en áreas más representativas del útero (cortes longitudinales), en aras de corroborar los hallazgos del presente trabajo.

CONCLUSIONES

El trofoblasto, en las regiones cercanas al embrión parece inducir la angiogénesis en la propia-submucosa subepitelial del endometrio, haciéndose evidente a los 20 y 24 d de la gestación, pero no a los 14 d de ésta.

En la fase progestacional del CE, bajo las condiciones del presente estudio, hay un mayor valor de ACS en el endometrio, en comparación con lo que sucede durante la fase estrogénica, sin que haya una clara explicación del por qué de estos resultados.

AGRADECIMIENTO

Esta investigación fue financiada por la Universidad Nacional de Colombia; Colciencias y La Universidad del Zulia, Venezuela.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] ATHANASSIADES, A.; HAMILTON, G.S.; LALA, P.K. Vascular endothelial growth factor stimulates proliferation but not migration or invasiveness in human extravillous trophoblast. *Biol. Reprod.* 59(3):643-654. 1998.

[2] BUSSOLINO, F.; MANTOVANI, A.; PERSICO, G. Molecular mechanisms of blood vessel formation. *Trends in Biochemical Sciences*, 22, NO. 7. 251-256. 1997.

[3] CARMELIET, V.; FERREIRA, G.; BREIER, S.; POLLEFEY, L. KIECKENS, GERTSENSTEIN, M.; FAHRIG, A.; VANDENHOECK, K.; HARPAL, C.; EBERHARDT, C.; DECLERCQ, J.; PAWLING, L.; MOONS, D.; COLLEN, W.; RISAU, A.; NAGY, A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Comments. Scientist.* 13(3): 15-15. 1999.

[4] CLAVIJO, E.; HERNÁNDEZ, A. Diferencias en la vascularización de varias zonas del endometrio bovino. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 4: 39-49, 1982.

[5] DANTZER, V.; LEISER R. Initial Vascularization in the Pig Placental: I. Demonstration of Nonglandular Areas by Histology and Corrosion casts. *The Anatomical Record.* 238: 177-190, 1994.

[6] DIAZ, D.; HERNÁNDEZ, A.; GIL, A. Niveles de progesterona y morfometría endometrial durante el ciclo estral de la vaca. *Rev. Med. Zoot.* 39:15. 1986.

[7] DISALVO, J.; BAYNE, M.L.; CONN, G.; KWOK, P.W.; TRIVEDI, P.G.; SODERMAN, D.D.; PALISI, T.M.; SULLIVAN, K.A.; THOMAS, K.A. Purification and characterization of a naturally occurring vascular endothelial growth factor: Placenta growth factor heterodimer. *J-Biol-Chem.* 270(13): 7717-7723, 1995.

[8] DORÉ, J.J.E. Jr.; WILKINSON, E.; GODKIN, J.D. Early gestational expression of transforming growth factor beta isoforms by the ovine placenta. *Biol. Reprod.* 53: 143-152, 1995.

[9] DORÉ, J.J.; WILKINSON, J.E.; GODKIN, J.D. Ovine endometrial expression of transforming growth factor beta isoforms during the peri-implantation period. *Biol. Reprod.* 54(5): 1080-1087. 1996.

[10] GAVIRIA, M.T.; HERNÁNDEZ, A. Morphometry of implantation in the sheep. I. Trophoblast attachment, modification of the uterine lining, conceptus size and embryo location. *Theriogenology.* 41:1139-1149. 1994.

[11] GHOSH D.; KUMAR P.G.; SENGUPTA J. Effect of early luteal phase administration of mifepristone (RU486) on leukaemia inhibitory factor, transforming growth factor beta and vascular endothelial growth factor in the implantation stage endometrium of the rhesus monkey. *J. Endocrinol.* 157(1): 115-125. 1998.

[12] GLEADE, J.M.; EBERT, B.L.; FIRTH, J.D.; RATCLIFFE, P.J. Regulation of angiogenic growth factor expression by hypoxia, transition metals, and chelating agents. *Am. J. Physiol.* 268(6 Pt 1): C1362-1368, 1995.

[13] HERNÁNDEZ, A. The development of the extremities of the placenta of the domestic sheep. (Thesis M.Sc, Inglés). dissertation. University of Bristol, England, 1971.

[14] JOJOVIC M.; WOLF, F.; MANGOLD, U. Epidermal growth factor, vascular endothelial growth factor and progesterone promote placental development in rat whole-embryo culture. *Anat. Embryol.* 198(2):133-198.

[15] LUNA, L.G. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 1968. 3ª ed. American Registry of Pathology, Washington, DC, 258 pp.

[16] NI, Y.J.; MAY, V.; BRAAS, K.; OSOL, G. Pregnancy augments uteroplacental vascular endothelial growth factor gene expression and vasodilator effects. *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Phys.* 42(2): H938-H944. 1997.

[17] REYNOLDS, L.P.; KIRSCH, J.D.; KRAFT, K.C.; REDMER, D.A. Time-course of the uterine response to estradiol-17beta in ovariectomized ewes: expression of angiogenic factors. *Biol. Reprod.* 59(3):613-620. 1988.

[18] SIMMEN, R.C.M.; SIMMEN, F.A.; BAZER, F.W. Regulation of synthesis of uterine secretory proteins: evidence for differential induction of porcine uteroferrin and anti-

- leukoproteinase gene expression. *Biol. Reprod.* **44**: 191-200, 1991.
- [19] Statistical Analysis System Institute Inc. SAS User's Guide statistics. Cary, N.C. Version 5.0. 1985.
- [20] TAICHMAN, N. S., YOUNG, S., CRUCHLEY, A. T., TAYLOR, P., PALEOLOG, E. Human neutrophils secrete vascular endothelial growth factor. *J. Leukocyte Biol.* **62**, No. 3, 397-400, 1997.
- [21] TORRY, D.S.; TORRY, R.J. Angiogenesis and the expression of vascular endothelial growth factor in endometrium and placenta. *Ame. J. Reprod. Immunol.* **37**(1). 21-29, 1997.
- [22] UMAÑA, J.; HERNÁNDEZ, A. 1994. Densidad capilar en el útero bovino durante la implantación. *Rev. ACOVEZ.* 19:10-12. 1994.
- [23] WATANABE, A.; YASUMIZU, T.; HOSHI, K.; KATOH, R.; KAWAOI, A.; SHIBUYA, M. Vascular endothelial growth factor expression in the rat uterus and placenta throughout pregnancy. *Acta Histochem. Cytochem.* **31**(5), 419-426. 1998.
- [24] YOSHIDA, S. ONO, M. Involvement of interleukin 8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha dependent angiogenesis. *Mol. Cell Biol.* **17**:4015-4023. 1997.