

NÚMERO DE VASOS SANGUÍNEOS Y EXPRESIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR Y DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA ENDOTELIAL E INDUCIDA EN LA ALANTOIDES OVINA

Blood Vessels Number, Endothelial Vascular Growth Factor, Induced Nitric Oxide Synthase and Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression in the Ovine Allantois

Piedad C. Rivas¹, José M. Rodríguez-Márquez² y Aureliano Hernández^{3}*

¹Estudiante de Postgrado, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

²Unidad de Investigaciones en Ciencias Morfológicas (UNICIM), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, Apartado 15252. Maracaibo 4005-A, Venezuela. E-mail: jmrodrim@cantv.net.

³Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. Telf.: 57-1-3169254, fax 57-1-2574159. E-mail: ahernandezv@unal.edu.co

RESUMEN

Usando una prueba inmunohistoquímica, se calculó el porcentaje de células mesenquimales de la alantoides ovina que expresaban el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) y dos isoformas de la Óxido Nítrico Sintasa endotelial (eNOS) e inducida (iNOS), y el número de vasos sanguíneos en la gestación inicial. Mientras que los porcentajes de VEGF, iNOS y eNOS disminuyeron drásticamente entre los 28 y los 35 días de gestación, el número de vasos sanguíneos aumentó ($P < 0,01$). Existieron diferencias significativas entre los animales de una misma edad de gestación, para el porcentaje de VEGF, porcentaje de las NOS y número de vasos sanguíneos ($P < 0,01$), lo cual podría indicar la participación de un factor genético determinante de la vasculogénesis, como ocurre en otras especies. No toda la población de las células mesenquimales es utilizada en la vasculogénesis. No se encontró expresión de VEGF en el trofoblasto, mientras que las dos isoformas de NOS mostraron diferente reacción inmunohistoquímica, siendo más intensa la reacción observada de eNOS que la de iNOS. En conclusión, para que el proceso de vascularización sea exitoso se requiere de la expresión de VEGF, y de dos isoformas de la NOS, las cuales al ser estimuladas por el VEGF, provocan la liberación de óxido nítrico, para potenciar la acción del factor angiogénico favoreciendo la viabilidad de los embriones.

Palabras clave: Óxido nítrico sintasa, VEGF, vasculogénesis, oveja, alantoides, implantación.

ABSTRACT

The number of blood vessels and the percentage of allantoic mesenchymal cells immunochemically expressing vascular endothelial growth factor (VEGF), induced nitric oxide synthase (iNOS) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) were calculated during early gestation in sheep. The percentages of VEGF, iNOS and eNOS drastically diminished between 28 and 35 d of gestation, and the number of blood vessels augmented ($P < 0.01$). There were statistically significant differences among animals at the same gestational age for all calculated values, which might imply a genetic influence for vascular development, as reported in other species. The whole population of mesenchymal cells does not participate in vasculogenesis. There was not trophoblastic VEGF expression, but eNOS was more intensely expressed than iNOS. In conclusion, in order to have a successful vascular development in the allantois it appears that VEGF, iNOS and eNOS must be expressed which could provoke liberation of nitric oxide thus enhancing the angiogenic factor function, to favour embryonic viability.

Key words: Nitric oxide synthase, VEGF, vasculogenesis, sheep, allantois, implantation.

INTRODUCCIÓN

El mantenimiento de la preñez depende en gran parte del intenso crecimiento y formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), asociados con el desarrollo de una efi-

ciente interfase materno-fetal. Algunas citoquinas y factores de crecimiento modulan el crecimiento trofoblástico y sus funciones [25]. La angiogénesis es un proceso estrictamente regulado por inductores extracelulares, que estimulan la migración y proliferación de las células endoteliales, aunque hay otras moléculas que contrarrestan este efecto. Cambios en el balance relativo entre inductores e inhibidores activan "el interruptor angiogénico", para estimular las moléculas que modulan la maduración de los nacientes vasos sanguíneos [3]. Existe un acervo bibliográfico importante en relación con el desarrollo vascular durante la segunda mitad de la gestación [2, 23], pero es escaso en relación con la producción del factor o factores de crecimiento (VEGF) responsables de la angiogénesis durante la implantación en la oveja. El VEGF es el que tiene (aparentemente) mayor participación en la angiogénesis [26], aunque también se ha demostrado la participación de las angiopoietinas después de la implantación [9].

El VEGF en la oveja es un péptido de 164 aminoácidos [6] que actúa como potente factor angiogénico, mantiene la integridad del endotelio y es importante en el desarrollo placentario [5]. El VEGF es un mitógeno específico de las células endoteliales vasculares, promueve la neovascularización *in vivo* [16], y regula el crecimiento y permeabilidad de los vasos sanguíneos [10].

El desarrollo vascular está controlado, a través de la participación del VEGF, por acción de la progesterona y los estrógenos [17]. La vascularización alantoidea todavía es incompleta a los 35 días de la gestación y existe gran variabilidad en su grado de desarrollo en los diferentes individuos. Por otro lado, una de las características clave para determinar la muerte embrionaria en la oveja, es la ausencia de vasos sanguíneos en la alantoides [7]. Por lo tanto, la mayor o menor expresión de VEGF en la alantoides puede estar correlacionada con el proceso de muerte o supervivencia embrionaria. No hay reportes en la literatura acerca de la presencia de VEGF en la alantoides en ovinos durante la implantación y de las posibles fluctuaciones cuantitativas en diferentes etapas y zonas de la alantoides.

El presente trabajo se diseñó para determinar la presencia de VEGF, de la iNOS y la eNOS en la alantoides ovina durante la implantación en la oveja, así como la cantidad de vasos sanguíneos en la alantoides y las diferencias individuales y variaciones en cuanto al grado de expresión de VEGF, de iNOS y eNOS de acuerdo con la edad de gestación y zonas alantoideas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron doce hembras ovinas mestizas clínicamente sanas, en buen estado nutricional; las ovejas, se sacrificaron por sangría previa insensibilización en los días 20 (n = 4), 28 (n = 4) y 35 (n = 4) de la gestación y mantenidas en obser-

vación durante dos ciclos estrales. El estro fue detectado por observación directa (dos veces al día), usando un macho caudoepidectomizado provisto de un chaleco marcador. El servicio fue por monta natural de un carnero entero, luego de detectado el celo. Se tomó como día primero de la gestación, el día siguiente a la monta natural.

Los úteros recolectados dentro de los 5 minutos siguientes al sacrificio, fueron fijados por perfusión con glutaraldehído (solución al 1,5% de pH 7,0) a través de las arterias uterina media y vaginal y luego fijados en formalina tamponada al 10% por más de 24 horas.

Se realizaron cortes consecutivos del saco corioalantoideo de aproximadamente 2 cm cada uno, a lo largo de la línea media dorsal del mismo, de tal manera, que se abarcó toda la extensión del *conceptus* en el plano mencionado. Los cortes fueron procesados para inclusión en parafina, obteniendo posteriormente secciones de 5 micrómetros de grosor. Ellos fueron colocados sobre láminas portaobjetos preparadas previamente con el adhesivo tisular Poli-L-Lisina y procesados para análisis inmunohistoquímico por medio de la técnica Avidin-Biotin-Peroxidasa, usando un anticuerpo contra VEGF, y otro contra NOS de tipo endotelial e inducible (eNOS y iNOS; Sigma, Inc.) los cuales revelan la presencia de las moléculas en los tejidos. Como control positivo para VEGF y las NOS se usaron cortes de piel y de aorta fetal. Para la cuantificación de vasos sanguíneos alantoideos, se usaron cortes vecinos a los empleados para inmunohistoquímica y una coloración estándar con hematoxilina y eosina. Se obtuvieron como parámetros de evaluación: a) porcentaje VEGF, células con marcación observadas, en relación con todas las células mesenquimales de la alantoides presentes en todos los cortes obtenidos, utilizando el objetivo de 100 X. b) Porcentaje de iNOS: porcentaje de células con marcación, en relación con todas las células alantocoriónicas presentes en todos los cortes obtenidos, utilizando el objetivo de 100 X. c) Porcentaje de eNOS: lo mismo que para iNOS; d) número de vasos alantoideos: el total de vasos sanguíneos presentes en todos los cortes preparados de la alantoides, para obtener el número de vasos por corte histológico.

Se hizo una observación a fin de detectar células trofoblásticas inmunoreactivas para VEGF o para las isoformas de NOS.

Se utilizó estadística descriptiva para análisis de los resultados en las diferentes variables: zona histológica (cada corte longitudinal es una zona histológica) y día de implantación, pruebas *t-student* para comparación de medias independientes, así como un análisis usando el procedimiento ANAVA de un diseño para determinar diferencias de número de células productoras de VEGF, de NOS así como la diferencia en el número de vasos alantoideos entre las variables subsectores histológicos y los días de implantación con un procedimiento sistematizado [20].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La marcación de las tres moléculas estudiadas se hizo más evidente en las zonas aledañas del embrión, en donde además, se detectó una mayor densidad vascular, en comparación con lo que se observó en las zonas alejadas del mismo.

No se observó inmunomarcación para VEGF en el trofoblasto en ninguna de las muestras analizadas, mientras que las dos isoformas de NOS mostraron alguna reacción, siendo eNOS más fuerte que iNOS.

Se hallaron diferencias significativas para porcentaje de VEGF, porcentaje de iNOS y eNOS y en cuanto al número de vasos alantoideos entre animales en un día determinado de gestación ($P < 0,01$). Hubo diferencias significativas en el porcentaje de VEGF, porcentaje de NOS y el número de vasos alantoideos entre las zonas histológicas (cada zona es un corte histológico) de un animal en un día de gestación determinado ($P < 0,01$). En las extremidades del saco corioalantoideo, no se encontró expresión de VEGF, ni de NOS, ni tampoco vasos sanguíneos en los días 28 y 35 de gestación, mientras que en las muestras tomadas de animales en el día 20 de la gestación, la expresión de VEGF y NOS estuvo presente pero en un porcentaje muy bajo. El número de vasos presentes en esta zona histológica durante el día 20 fue muy reducido.

Los porcentajes de expresión de VEGF y de iNOS y eNOS disminuyeron significativamente a medida que la gestación avanzaba ($P < 0,01$). El día 20 para el porcentaje de VEGF se obtuvo un promedio de $41,74 \pm 11,73$; a los 28 de $24,20 \pm 10,86$ y a los 35 de $3,0 \pm 7,02$. Para el día 20 se obtuvo un promedio de $38,96 \pm 8,02$; a los 28 de $22,89 \pm 11,82$ y a los 35 de $2,3 \pm 4,51$ en el porcentaje de eNOS. Los porcentajes de iNOS encontrados fueron para el día 20 de $42,28 \pm 7,02$; el día 28 de $25,05 \pm 10,82$ y el día 35 de $2,6 \pm 3,01$ (TABLA I). Estos resultados de ONS coinciden con los reportados para ratas cuya expresión fue mayor del día 4 al 10 de gestación [13].

Para el número de vasos alantoideos, se detectaron diferencias significativas al comparar los valores obtenidos en las 3 edades de gestación, observándose claramente un aumento con el avance de la gestación ($P < 0,01$; TABLA I).

Aunque hubo correlación positiva entre los porcentajes de VEGF y de las dos isoformas de NOS ($r = 0,70$; $P < 0,05$), el porcentaje de marcación de eNOS fue ligeramente más bajo que el porcentaje de iNOS y VEGF.

Dadas las diferencias individuales halladas en relación con los parámetros estudiados en animales de una misma edad de gestación, es posible postular que hay un trasfondo genético en el proceso de vasculogénesis alantoidea.

La expresión de ambos alelos del gen que codifica para VEGF es necesaria para lograr la respuesta angiogénica [10, 26]; además, las secuencias de NOS sugieren que las tres isoformas, son producto de diferentes genes, aunque al comparar las secuencias de cerebro de rata y bovino se encuentra un principio común derivado del mismo gene [18]. Estas afirmaciones podrían explicar en parte las diferencias entre individuos encontradas en el presente estudio, ya que la expresión genética de determinados alelos puede variar en cada individuo. Esto podría indicar que hay individuos que tienen una constitución genética ventajosa para sobrevivir en el útero. El VEGF aparece como un factor importante en la angiogénesis, por cuanto se ha comprobado que es el único que al ser interrumpido su funcionamiento en ratones, ocasiona una pérdida embrionaria [26]. Existe un trastorno en la vascularización en embriones heterocigotos o VEGF deficientes +/- que se acentúa en los homocigotos VEGF deficientes [4, 15, 21]. En el cerdo se ha propuesto que una mayor expresión del VEGF podría ser indicativo de una mayor eficiencia vascular en relación con el intercambio placentario [27].

Dado que la inmunomarcación para VEGF en el trofoblasto estuvo ausente, es posible que la vasculogénesis alantoidea, esté dependiendo principalmente, en cuanto a la producción de VEGF, de la expresión genética del embrión, al menos durante el lapso estudiado.

Durante el periodo de la gestación estudiado, no toda la población de células mesenquimales disponibles en la alantoides sería utilizada para la formación de vasos sanguíneos, lo cual es más evidente hacia las extremidades del *conceptus*. La mayor densidad vascular de las zonas vecinas al embrión podía tomarse como un mecanismo que garantiza una eficiencia respiratoria en las áreas aledañas al embrión. Sin embargo, no aparecen en la literatura estudios que determinen en

TABLA I
PORCENTAJE DE MARCACIÓN DE VEGF, INOS, ENOS Y NÚMERO PROMEDIO DE VASOS SANGUÍNEOS EN LA CORIOALANTOIDES DE LA OVEJA, DE ACUERDO CON LOS DÍAS 20, 28 Y 35 DE GESTACIÓN (DG) ($\bar{X} \pm DE$) / PERCENTAGE OF EXPRESSION VEGF, INOS, ENOS AND NUMBER AVERAGE OF BLOOD VESSELS IN THE CHORIOALANTOIC, IN ACCORDANCE WITH THE DAYS 20, 28 AND 35 OF GESTATION (DG) IN SHEEP ($\bar{X} \pm SD$)

EG	% VEGF	% iNOS	% eNOS	Nº de vasos
20	$41,74 \pm 11,73^a$	$42,28 \pm 7,02^a$	$38,96 \pm 8,02^a$	$23,73 \pm 4,19^a$
28	$24,2 \pm 10,86^b$	$25,05 \pm 10,82^b$	$22,89 \pm 11,82^b$	$32,16 \pm 11,49^b$
35	$3,0 \pm 7,02^c$	$2,6 \pm 3,01^c$	$2,3 \pm 4,51^c$	$51,62 \pm 3,6^c$

Las letras disímiles, denotan diferencias entre edades de gestación ($P < 0,01$). \bar{X} = promedio. DE = Desviación Estándar. ED = edad de gestación.

que momento se inicia el intercambio de gases respiratorios en la placenta ovina, si bien el corazón del embrión comienza a latir antes del día 20 de la gestación.

El presente trabajo corroboró desde el punto de vista microscópico, hallazgos macroscópicos previos realizados en ovinos [7] y bovinos [8]. En vacas, se ha comprobado que la vascularización de las membranas extraembrionarias durante la implantación aumenta con la edad de gestación [8], lo que se confirma en el presente estudio. En etapas posteriores de la preñez, en la oveja, también hay un incremento significativo de la vascularización alantoidea [6]. La presencia de las dos isoformas de NOS puede relacionarse con la expresión de VEGF en los tejidos estudiados, ya que se ha demostrado en caninos que el VEGF depende del óxido nítrico en las arterias coronarias para ejercer sus funciones y que puede activar a las NOS ubicadas en las células endoteliales, para que ejerzan una acción de relajación [22]. En la placenta ovina, la participación de la NOS en la angiogénesis ha sido demostrada [12, 28], siendo posible pensar que tanto VEGF como las NOS interactúan en el proceso de vascularización del embrión y de sus membranas, lo que coincide con lo reportado en ratones [11], así como en ovinos y bovinos [29], donde también se demostró el papel del ON en la implantación, en estas dos últimas especies se demostró *in vitro* que el ON tiene un efecto luteotrópico al aumentar la PGE₂.

Se ha sugerido que la muerte celular de las extremidades alantocoriónicas en ovinos que se observa hacia los 22 días de la gestación podría deberse a isquemia [7], lo cual corroboraría lo encontrado en el presente trabajo.

La disminución en el porcentaje de VEGF y de NOS podría implicar que existen otros factores que cobrarían mayor importancia en la vasculogénesis con el avance de la gestación, pues en zonas comparables del *conceptus* a los 35 días de gestación, hay menor número de células inmunopositivas para VEGF y NOS que a los 20 o 28 días. Dicha disminución podría indicar una interacción entre las moléculas mencionadas.

Además, puede ser indicativo de la participación de otras moléculas en la vasculogénesis alantoidea. Entre ellas, el factor de crecimiento placentario, de la familia del VEGF que se expresa en el trofoblasto humano con posible acción paracrina en el endometrio [22]. Otras moléculas serían las angiopoietinas y el factor activador de las plaquetas, aunque estarían actuando en la gestación más tardíamente, cuando se desarrolla la pared vascular, en consonancia con otra serie de factores [24].

En el presente trabajo no se encontró expresión de VEGF en el trofoblasto, lo cual concuerda con lo hallado por Clark y col. [5], quienes a su vez reportan que los resultados son variables. Se encontró reacción de ambas isoformas de NOS en el trofoblasto aunque en cantidad e intensidad menor que en el mesodermo espláncico, lo que concuerda con los

hallazgos previos [14]. Esto podría implicar que la vasculogénesis alantoidea, durante el lapso estudiado, depende en alta proporción de la expresión genética del embrión, más que del control materno. En el trofoblasto humano, sin embargo, se ha reportado un papel del VEGF en la proliferación del mencionado epitelio [1].

Existe un mecanismo de control de la acción del VEGF, mediante la expresión de un antagonista específico [3, 5], lo cual podría explicar las diferencias zonales aquí encontradas, así como la disminución en la expresión de VEGF con el avance de la gestación.

El aumento de la vasculogénesis en la alantoides en la oveja entre los días 20 y 35 de la gestación, puede explicarse, al menos en parte, por la expresión del VEGF en las células mesenquimales. Sin embargo, no deben descartarse los mecanismos de control en este proceso que pueden ser ejercidos por otros tejidos. En ruminantes se considera que la producción de factores angiogénicos iniciales está a cargo de la parte materna de la placenta, siendo este tejido el que podría dirigir la vascularización, y los factores antiangiogénicos serían producidos por el tejido placentar fetal [19]. En las ovejas, la actividad mitógena de las células endoteliales es producida por el endometrio únicamente durante la preñez temprana, que es un período durante el cual ocurre el más dramático crecimiento vascular endometrial. Aunque se sabe que la actividad mitógena endotelial depende de una molécula con masa molecular relativamente alta (100 kDa) y que es muy lábil, ésta no ha sido caracterizada; sin embargo, existen estudios en los cuales se identificaron los mitógenos producidos en el endometrio ovino en las células endoteliales y en las células 3T3 durante la preñez temprana [26]. También se ha reportado que la producción de esta actividad mitógena endotelial es mayor en el día 24 de gestación, y que está relacionada inmunológicamente con el Factor de Crecimiento Fibroblástico. Se ha reportado la presencia del VEGF en cantidades importantes en los tejidos fetal y placentar en los días 24 y 120 de preñez por medio de estudios inmunohistoquímicos [30].

CONCLUSIONES

La viabilidad de los embriones es favorecida por un adecuado proceso de vascularización el cual requiere de la expresión de VEGF, y de dos isoformas de la NOS, las cuales al ser estimuladas por el VEGF, provocan la liberación de óxido nítrico, para potenciar la acción del factor angiogénico.

La formación de vasos sanguíneos en la alantoides, entre los días 20 a 35 de la gestación, presenta diferencias entre individuos y en general, no es similar en las diversas zonas de la alantoides; es mayor en las zonas aledañas al embrión y menor hacia las extremidades del saco corioalantoideo.

Es posible que a partir de los 35 días de la gestación se produzca la participación de otras moléculas, diferentes al

VEGF, iNOS y eNOS, en la vasculogénesis corioalantoidea, lo cual necesita mayor investigación.

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo fue auspiciado por Colciencias y las Universidades Nacional de Colombia y del Zulia de 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: 643-654. 1998.
- [2] BOROWICZ, P.P.; ARNOLD, D.R.; GRAZUL-BILSKA, A.T.; REDMER, D.A.; REYNOLDS, L.P. Modelling vascular growth in the sheep placentome. **Biol Reprod** 68 (Suppl. 1): 150. 2003.
- [3] BUSSOLINO, F.; MANTOVANI, A.; PERSICO, G. Molecular Mechanisms of Blood Vessel Formation. **TIBS** 22:251-256.1997.
- [4] CARMELIET, P.; FERREIRA, V.; BREIER, G.; POLLEFEYT, S.; KIECKENS, L.; GERTSENSTEIN, M. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. **Nature** 380:435-39. 1996.
- [5] CLARK, D.E.; SMITH, S.K.; HE, Y.; DAY, K.A.; LICENCE, D.R.; CORPS, A.N. A vascular endothelial growth factor antagonist is produced by the human placenta and released into the maternal circulation. **Biol. Reprod.** 59:1540-1548.1998.
- [6] CHEUNG, C.Y.; BRACE, R.A. Ovine vascular endothelial growth factor: nucleotide sequence and expression in fetal tissues. **Growth Fact** 16:11-22. 1998.
- [7] HERNÁNDEZ, A. The development of the extremities of the placenta of the domestic sheep. University of Bristol (Master Thesis). 82pp. 1971.
- [8] JIMÉNEZ, L. Estudios Morfométricos e Histológicos en el Alantocorion bovino durante los días 27 a 88 de la gestación.. Universidad Nacional de Colombia (Tesis de Grado). 78 pp. 1982.
- [9] KOH, G.Y.; KIM, I.; KWAK, H.J.; YUN, M.J.; LEEM, J.C. Biomedical significance of endothelial cell specific growth factor, angiopoietin. **Exp Molec Med** 34: 1-11. 2002.
- [10] KOPERLAINEN, E.; KARKKAINEN, M.; TEHUNEN, A.; RAUVALA, H. Overexpression of VEGF in testis and epididymus causes infertility in transgenic mice: evidence for non endothelial targets for VEGF. **J. Cell. Biol.** 143(6): 1705-1712. 1998.
- [11] KWOK, W.; STEUERWALD, N.; HUET-HUDSON, Y. Estrogen regulation of nos isoforms in the mouse perimplantation uterus. **The Society for the Study of Reproduction. 38th Annual Meeting.** Quebec, Canada. July 24-27. W564. 2005.
- [12] KWON, H.; WU, G.; MEININGER, C.J.; FULLER W.; BAZER, F.W.; SPENCER, T.E. Developmental Changes in Nitric Oxide Synthesis in the Ovine placenta. **Biol. Reprod.** 70:679-686.2004.
- [13] NISHIMURA, K.; GAMO, T.; SOH, T.; YAMAUCHI, N.; HATTORI, M. Changes of nitric oxide synthases expression in rat uterus correlated with estrous [cycle] and pregnancy. **The Society for the Study of Reproduction. 38th Annual Meeting.** Quebec, Canada. July 24-27. T563. 2005.
- [14] LEE, K.; BAEK, M.; MOON, K.; SONG, W.; CHUNG, C.; HA, D.; KANG, M. Nitric Oxide as a Messenger Molecule for Myoblast Fusion. **J. Biol. Chem.** 269: 14371-14374. 1994.
- [15] LEE, P.C.; SALLYAPONGSE, A.N.; BRAGDON, G.A.; SHEARS, LL.II.; WATKINS, S.C.; EDINGTON, H.D.; BILLIAR, T.R. Impaired wound healing and angiogenesis in eNOS-deficient mice. **Am J Physiol.** 277: H1600-H1608. 1999.
- [16] LI, J.; PERRELLA, M.; TSAI, J. Induction of Vascular Endothelial Growth Factor Gene Expression by Interleukin-1B in Rat Aortic Smooth Muscle Cells. **J Biol Chem.** 270: 308-312.1995.
- [17] MA, W.; TAN, J.; MATSUMOTO, H.; ROBERT, B.; ABRAHAMSON, D. R.; DAS, S. K.; DEY, S. K. Adult Tissue Angiogenesis: Evidence for Negative Regulation by Estrogen in the Uterus **Mol. Endocrinol.** 15: 1983-1992. 2001.
- [18] MARLETTA, M. Nitric Oxide Synthase Structure and Mechanism. **J. Biol. Chem.** 268: 12231-12234.1993.
- [19] MILLAWAY, D.S.; REDMAR, D.A.; KIRSCH, J.D.; ANTHONY, R.V.; REYNOLDS, L.P. Angiogenic activity of maternal and fetal placental tissues of ewes throughout gestation. **J. Reprod. Fertil.** 86(2): 689-696.1989.
- [20] MINITAB STATISTIC PROGRAM. Versión 7,2. 1989.
- [21] UROHARA, T.; ASAHARA, T.; SILVER, M.; BAUTERS, C.; MASUDA, H.; KALKA, C.; KEARNEY, M.; CHEN, D.; SYMES, J.F.; FISHMAN, M.C.; HUANG, P.L.; ISNER, J.M. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. **J Clin Invest.**101: 2567-2578. 1998.
- [22] NI, Y.; MAY, V.; BRAAS, K. Pregnancy Augments Uteroplacental Vascular Endothelial Growth Factor Gene Expression and Vasodilatator Effects. **Am J Physiol.** 273: H938-H944. 1997.
- [23] REYNOLDS, L.P.; BOROWICZ, P.P.; KIMBERLY, A.; VONNAHME, K.A.; JOHNSON, M.L.; GRAZUL-BILSKA,

- A.T.; REDMER, D.A.; CATON, J.S. Placental angiogenesis in sheep models of compromised pregnancy. **J. Physiol.** 565:43-58. 2005.
- [24] ROSSANT, J.; HOWARD, L. Signaling pathways in vascular development. **Ann. Rev. Cell Dev. Biol.** 18: 549-573. 2002.
- [25] SHARKEY, A. Cytokines and implantation. **Rev. of Reprod.** 3:52-61. 1998.
- [26] TORRY, D.; TORRY, R. Angiogenesis and the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Endometrium and Placenta. **Amer J of Reprod Immunol**, 37: 21-29. 1997.
- [27] VONNAHME, K.A.; FORD, S.P. Differential Expression of the Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor System in the Gravid Uterus of Yorkshire and Meishan Pigs. **Biol Reprod.** 71(1): 163-169. 2004.
- [28] VONNAHME, K.A.; WILSON, M.E.; LI, Y.; RUPNOW, H.L.; PHERNETTON, T.M.; FORD, S.P. MAGNESS, R.R. Circulating levels of nitric oxide and vascular endothelial growth factor throughout ovine pregnancy. **J Physiol.** 565(1):101-109. 2005.
- [29] WEEMS, Ch.; WEEMS, Y.; UCHIMA, T.; LENNON, E.; RANEY, A.; GOTO, K.; ONG, A.; ZALESKI, H.; TATMAN, S.; NEUENDORFF, D.; RANDEL, R. Effects of nitric oxide and endothelin-1 on caruncular endometrial secretion of PGE2 and PGF2. **The Society for the Study of Reproduction. 38th Annual Meeting.** Quebec, Canada. July 24-27. M577.2005.
- [30] ZHENG, J.; REDMER, D. Characterization of Heparin-Binding Endothelial Mitogen (s) Produced by the Ovine Endometrium During Early Pregnancy. **Biochem Cell Biol**, 76: 89-96. 1998.