



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FISICO-QUIMICAS Y NATURALES

Trabajo Final de grado para optar al título de Licenciada en Ciencias Biológicas

*“Inmunolocalización de Angiopoyetina-1 y su receptor Tie-2
en placentas de cabras a lo largo de la gestación”*

MURA, NADYA MICAELA

**Agosto 2017
RIO CUARTO-CÓRDOBA**

“Inmunolocalización de Angiopoyetina-1 y su receptor Tie-2 en placentas de cabras a lo largo de la gestación”

Tesista: Mura, Nadya Micaela

Directora: Dra. Andrea Bozzo



Universidad Nacional de Río Cuarto



El presente trabajo fue realizado en la Cátedra de Biología Celular y Embriología General, Departamento de Anatomía Animal de la Facultad de Agronomía y Veterinaria. Se presenta como requerimiento para optar al grado de Licenciada en Ciencias Biológicas.

Tesis de Grado

“Inmunolocalización de Angiopoyetina-1 y su receptor Tie-2 en placentas de cabras a lo largo de la gestación”

Tesista: Mura, Nadya Micaela

Directora: Dra. Andrea Bozzo

Jurado:

Dra. Andrea Bozzo

Dra. Alicia Rolando

Dra. Romina Principe

Agosto de 2017

Quiero agradecer:

- ✓ *A mis padres Nora y Raúl por todo el apoyo que me brindaron todos estos años en la carrera como en la vida.*
- ✓ *A mis hermanos, Agustín y Cristela por acompañarme en todo este proceso.*
- ✓ *A mi abuela por estar siempre presente.*
- ✓ *A mis amigas Anto, Sabri y Flor por compartir esta hermosa carrera y por estar presentes en todo momento.*
- ✓ *A mis compañeros, Juan y Tato por hacer que esta carrera sea más fácil de llevar, por los mates compartidos, las comidas y las charlas.*
- ✓ *A Gaby por ser mi guía.*
- ✓ *Al resto de mi familia, primos, tíos, por brindarme su apoyo.*
- ✓ *A la Dra. Andrea Bozzo por lo que me enseñó y el tiempo que me dedicó.*
- ✓ *A Tomás por ayudarme, enseñarme y estar en todo este proceso.*
- ✓ *Al grupo de Biología Celular y Embriología por integrarme.*
- ✓ *Al jurado por ayudarme con mi trabajo final.*
- ✓ *A la UNRC por permitirme estudiar esta hermosa carrera.*

Resumen.....	I
Abreviaturas.....	II
Índice de figuras y gráficos.....	III
INTRODUCCIÓN	
Producción Caprina.....	1
Reproducción Caprina.....	2
Placentación.....	2
Angiogénesis.....	4
Angiopoyetinas.....	6
HIPÓTESIS.....	10
OBJETIVOS	
Objetivo general.....	10
Objetivos específicos.....	10
MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
RESULTADOS.....	15
DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.....	26
BIBLIOGRAFÍA.....	29

La cabra posee una placenta sinepiteliocorial, cotiledonaria y adecidua. Esta estructura interviene en la provisión de nutrientes al feto mediante la vascularización presente en interfase materno-fetal. El incremento y desarrollo del lecho vascular es un componente crítico para el crecimiento de todo tejido, incluyendo la placenta y el mantenimiento de la preñez. La Angiopoyetina-1 y su receptor Tie-2 participan en el proceso de angiogénesis y tienen un rol fundamental en el desarrollo y el crecimiento fetal, afectando la supervivencia y el crecimiento neonatal. Si bien existen algunos trabajos sobre el rol que desempeñan la Angiopoyetina 1 y su receptor en las placentas de animales domésticos, actualmente no se encuentra bibliografía disponible respecto a su localización e importancia en placentas caprinas a lo largo de la gestación. El objetivo de este estudio fue determinar la expresión del sistema Angiopoyetina-1/Tie-2 en placentas caprinas en diferentes estadios gestacionales. Se utilizaron 15 placentas provenientes de gestaciones de 50 (n=5), 100 (n=5) y 135 (n=5) días, se fijaron en formol tamponado al 10% y se procesaron de acuerdo a la técnica histológica convencional. Parte de los cortes se colorearon con hematoxilina-eosina para el análisis de la estructura por microscopía óptica y el resto se inmunomarcó con un anticuerpo anti-Ang-1 y su receptor con anti-Tie-2. La Ang-1 se evidenció en el epitelio trofoblástico de forma intensa en placentas de 50 y 100 días de gestación y en forma más débil en el epitelio materno y en los vasos sanguíneos fetales. En contraste, en placentas de 135 días de gestación, la inmunocoloración fue intensa sobre el epitelio materno y débil sobre el tejido fetal y endotelial. El receptor Tie-2 se localizó en las células endoteliales de capilares fetales, maternos y en el epitelio trofoblástico en los períodos analizados. Esto indicaría que el sistema Ang-1/Tie-2 actúa por un mecanismo de acción autócrino y parácrino sobre la angiogénesis junto a otros factores de crecimiento como el VEGF. El cambio en el patrón de inmunolocalización de Ang-1 observado hacia el final de la gestación podría indicar su importancia en la promoción de la maduración vascular y estabilización de los vasos maternos. Esta investigación podría contribuir al estudio de los mecanismos reguladores de los procesos involucrados en el desarrollo de la vascularización placentaria para optimizar la producción caprina teniendo en cuenta el contexto social donde se desarrolla.

ANG-1: Angiopoyetina 1

ANG-2: Angiopoyetina 2

ANOVA: Análisis de la varianza

CBN: Células binucleadas

CMN: Células mononucleadas

FGF: Factor de crecimiento fibroblástico

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

Figura 1: Microscopia óptica H/E de placentas caprinas de 50, 100 y 135 días de gestación.....	17
Figura 2: Inmunolocalización de Ang-1 en placentas de 50 días de gestación....	19
Figura 3: Inmunolocalización de Ang-1 en placentas de 100 días de gestación..	20
Figura 4: Inmunolocalización de Ang-1 en placentas de 135 días de gestación..	21
Figura 5: HSCORE de técnica inmunohistoquímica de Ang-1 en placentas de cabras gestantes.....	22
Figura 6: Inmunolocalización de Tie-2 en placentas de 50 días de gestación.....	23
Figura 7: Inmunolocalización de Tie-2 en placentas de 100 días de gestación....	24
Figura 8: Inmunolocalización de Tie-2 en placentas de 135 días de gestación....	25

INTRODUCCIÓN

MURA, NADYA MICAELA

PRODUCCIÓN CAPRINA

Los sistemas productivos caprinos en nuestro país se caracterizan por desarrollarse en forma extensiva sobre pastizales naturales muy degradados como consecuencia del sobrepastoreo y la tala indiscriminada. La problemática del sector caprino es integradora de limitantes sociales, productivas y ambientales, que al interactuar le confieren al sistema particularidades casi exclusivas (Chagra Dip *et al.*, 2010). Las explotaciones caprinas responden a una economía de subsistencia, de carácter familiar, con grandes carencias de registros técnicos y económicos, que se distribuyen en zonas marginales poco aptas para otras actividades (Bedotti *et al.*, 2007). Los establecimientos se encuentran generalmente apartados de las áreas urbanas donde el consumo es masivo, la oferta del producto es fragmentada y estacional, además no existe propiedad de la tierra. El principal destino de lo que se produce es la venta doméstica (Dayenoff *et al.*, 2015)

Argentina cuenta con un stock de alrededor de 4,8 millones de cabezas, que están muy dispersas geográfica y temporalmente. Según el censo de estratificación caprina del SENASA del 2013, los pequeños productores se distribuyen un 28,43% en la Región Noroeste, un 22,78% en la Patagonia, un 21,86% en Cuyo, un 17,96% en el Noreste y un 8,16% en el centro del país. Con respecto a su distribución a nivel provincial, en Mendoza se encuentra el 18% del sector caprino argentino, Neuquén posee el 18 %, mientras que Córdoba solo posee el 4% del total de la producción caprina del país (Dayenoff *et al.*, 2015).

A nivel nacional, la producción de carne caprina no tiene un impacto económico alto, pero es importante para las economías regionales donde es relevante como factor social al permitir la subsistencia de productores familiares (Zimmerman, 2013). Durante los últimos años la capricultura se ha destinado a la producción de leche, la cual se comercializa como tal o se la utiliza para la producción de quesos artesanales (Alonso *et al.*, 2012). La producción de fibra cashemere ocupa el tercer puesto de relevancia debido a que es apreciada por su suavidad y finura. La producción de cashemere en el país se encuentra en desarrollo en sistemas de producción tradicional, utilizando animales de raza criolla descendientes de animales asiáticos productores de fibra (Lanari *et al.*, 2004).

El sistema caprino posee muy bajos índices productivos, siendo su producción estacional en los meses estivales. Estos factores, sumados a la situación

particular de los productores, como escasos niveles de insumos externos, poco manejo, problemas de comercialización y deficiente transferencia de tecnología disponible para la producción de cabritos dan como resultado una baja eficiencia productiva/reproductiva, lo que se ve exacerbado por la susceptibilidad de las cabras a abortos frecuentes (Chagra Dip *et al.*, 2010).

La producción caprina es afectada por diversos factores ambientales como el fotoperiodo, la nutrición, las condiciones de estrés y el medio social. El primer factor, a su vez está regulado por cambios nutricionales que son influenciados por los sistemas de producción y las condiciones de cría. Las cabras tienen la ventaja de poder adaptarse a zonas semiáridas debido a la eficacia reproductiva, y su alta eficiencia digestiva para consumir forraje (Cueto *et al.*, 2000).

REPRODUCCIÓN CAPRINA

Las cabras (*Capra hircus*) presentan estacionalidad reproductiva comprendida entre el final del verano y el otoño, época que se caracteriza por una disminución de las horas luz (fotoperiodo negativo). Esto representa un mecanismo de adaptación por el cual las crías nacen en estaciones favorables para su supervivencia y crecimiento (Cueto *et al.*, 2000).

La especie caprina es poliéstrica estacional, con estros que se presentan dentro de los 19 a 21 días y cuya duración media de 18 a 36 horas. La actividad reproductiva comienza con el inicio de la pubertad, variando la edad de aparición en relación con el peso vivo del animal, comenzando los estros con ovulación cuando la hembra púber alcanza aproximadamente del 45 al 65% del peso de una hembra adulta. El periodo gestacional oscila entre 144 y 151 días con un promedio de 149 días. La gestación en ovejas y cabras, durante el primer trimestre, depende de la funcionalidad del cuerpo lúteo. Sin embargo, estas especies se diferencian en que posteriormente, en ovejas, la placenta pasa a ser la principal fuente de progesterona, mientras que en las cabras el cuerpo lúteo es indispensable para el mantenimiento de la gestación (Cueto *et al.*, 2000).

PLACENTACIÓN

El crecimiento y la supervivencia del feto durante su desarrollo dependen de la placenta, la cual se compone de tejidos maternos y fetales. El componente fetal está representado por el corion, que posteriormente se va a unir con el

alantoides, el cual le proporciona la vascularización y forma la placenta definitiva corionalantioidea. (Roa *et al.*, 2012). Este tejido extraembrionario que se sitúa entre el compartimento materno y fetal cumple con funciones nutritivas, respiratorias y de producción hormonal durante la gestación que son críticas para el desarrollo normal del embrión (Soares *et al.*, 1996; Redmer *et al.*, 2005; Khaled *et al.*, 2009). Estas funciones son posibles debido a la formación de una red vascular extensa desde el endometrio hacia la placenta (Roa *et al.*, 2012)

Los rumiantes poseen una placenta epiteliocorial; sin embargo, durante muchas décadas se consideró que, al menos en los pequeños rumiantes esta placenta era sindesmocorial debido a la pérdida del epitelio materno. Actualmente se conoce que en pequeños rumiantes el epitelio uterino no se pierde, sino que se fusiona con algunas células trofoblásticas para formar sincitios que tienen un doble origen: materno y fetal. Como consecuencia de esta fusión celular a esta placenta se la denomina sinepiteliocorial. El proceso de fusión ocurre porque en el trofoblasto hay células gigantes que frecuentemente son binucleadas y migran desde el epitelio coriónico para alcanzar el epitelio endometrial con el que se fusionan. A diferencia del resto de las células trofoblásticas, las células gigantes secretan hormonas proteicas y esteroides (Bazer *et al.*, 2009).

Las cabras, al igual que en otros rumiantes, presentan un epitelio placentario característico compuesto por dos tipos de células, las mononucleadas y las binucleadas que son morfológica y funcionalmente distintas en el trofoblasto (Igwebuike, 2009). Las células mononucleadas se encuentran normalmente en la interfase y se involucran principalmente en el intercambio de nutrientes, mientras que las binucleadas producen lactógeno placentario y progesterona (Igwebuike, 2009), y mediante el proceso de fusión con una célula epitelial uterina o con el sincitiotrofomaternal liberan su contenido al tejido conectivo materno (Wooding *et al.*, 1996). Además, estas células binucleadas participan en el desarrollo de las vellosidades y son una característica única en los rumiantes (Wooding *et al.*, 1996; Klisch *et al.*, 2010). En esta especie durante las primeras etapas de la placentación se observa que el corion tiene vellosidades que se distribuyen de manera uniforme, pero luego estas se redistribuyen agrupándose en cotiledones y dejando otras áreas libres dando origen al corion liso (Rojas y Rodríguez, 1987).

Desde el punto de vista morfológico la placenta es considerada cotiledonaria debido al desarrollo de áreas restringidas de interdigitación entre el tejido

materno y fetal, conocidas como placentomas (Santos *et al.*, 1998). Cada placentoma es el sitio de intercambio de nutrientes fetomaternos y está constituido por el tejido fetal cotiledonario que forma vellosidades que se corresponden con criptas maternas carunculares (Wooding y Burton, 2008). En las áreas de corion liso entre los cotiledones se encuentran vellosidades muy pequeñas, y frente a ellas se opone la mucosa intercaruncular, la cual posee muchas glándulas (Rojas y Rodríguez, 1987). En relación a la eliminación de los tejidos maternos durante el parto se clasifica como *adecidua* debido a que la reacción decidual es leve o no ocurre y por lo tanto no se eliminan restos del endometrio en el parto (Barbeito *et al.*, 2010).

La placenta juega un rol fundamental en la provisión de nutrientes al feto, este intercambio se realiza por el flujo sanguíneo uterino y umbilical los cuales, a su vez, obedecen a la vascularización de la interfase materno-fetal (Espinosa, 2011). El incremento y desarrollo del lecho vascular es un componente crítico para el crecimiento de todo tejido, incluyendo la placenta y el mantenimiento de la preñez (Reynolds *et al.*, 2005, 2010, Arroyo y Winn, 2008).

ANGIOGÉNESIS

Para el desarrollo de una red vascular placentaria funcional se requiere de la formación de nuevos vasos sanguíneos mediante dos procesos cooperativos y regulados, la vasculogénesis y la angiogénesis. El primer proceso implica el desarrollo de novo de la red vascular primitiva a partir de células endoteliales progenitoras, los angioblastos; mientras que, en la angiogénesis, la red vascular primitiva se utiliza como base para desarrollar nuevos vasos a partir de otros preexistentes (Kaufmann *et al.*, 2004). Es decir, durante la angiogénesis, las células que pierden contacto proliferan y migran, lo que termina en la brotación y ramificación de nuevos capilares a partir de los preexistentes (Shibuya y Claesson-Welsh, 2006; Wallez *et al.*, 2006; Adams y Alitalo, 2007; Lamalice *et al.*, 2007). La maduración adicional del vaso se realiza mediante el reclutamiento de células de soporte, que incluyen los pericitos y las células del músculo liso (Folkman y D'Amore, 1996; Lindahl *et al.*, 1997; Hellstrom *et al.*, 1999)

En el transcurso de la gestación el citotrofoblasto desencadena los procesos de vasculogénesis y angiogénesis y las células estromales activan el desarrollo de los vasos sanguíneos. De este modo, el crecimiento de la placenta con el incremento en el flujo sanguíneo del útero grávido y del cordón umbilical

dependen del desarrollo de una apropiada red vascular que surge de la angiogénesis (Reynolds *et al.*, 2005). En las vellosidades placentarias, el proceso angiogénico ocurre en presencia de un gradiente de oxígeno y de nutrientes que se extienden desde la circulación materna, pasando a través del trofoblasto y por la circulación fetal, de la cual se extraen los nutrientes y el oxígeno y son transferidos al feto en desarrollo (Kingdom *et al.*, 1997).

Tanto la vasculogénesis como la angiogénesis, tiene una importancia crítica debido a que los organismos tienen un requerimiento absoluto para el transporte efectivo de oxígeno, productos de desechos y nutrientes hacia y desde sus células constituyentes. Lo mismo ocurre en la placenta y el feto ya que para su óptimo crecimiento depende no solo de la formación de la vasculatura materna y fetal, sino también del aumento del flujo sanguíneo mientras la gestación progresa (Charnock Jones *et al.*, 2004).

La vascularización placentaria comienza al principio de la preñez y es imprescindible para la supervivencia embrionaria temprana y el crecimiento (Grazul-Bilska *et al.*, 2010, 2011, 2013). En esta etapa la angiogénesis progresa en los tejidos placentarios maternos y fetales, acompañado por el incremento del flujo sanguíneo uterino y umbilical (Greiss y Anderson, 1970; Reynolds, 1986; Reynolds y Redmer, 1995). Hay evidencias que la reducción del desarrollo vascular placentario y el aumento de la resistencia vascular se relaciona con la mortalidad embrionaria temprana. En etapas posteriores, factores tales como la nutrición inadecuada o la edad materna se asocian a una disminución de la vascularización en la placenta de varias especies (Redmer *et al.*, 2004; Reynolds *et al.*, 2006, 2013, Rennie *et al.*, 2011).

Debido a que la placenta crece rápidamente para satisfacer las crecientes necesidades metabólicas del feto, su vasculatura presenta plasticidad y cambia constantemente durante el transcurso de la gestación (Kingdom *et al.*, 2000; Larsen *et al.*, 2002; Mayhew *et al.*, 2002). Diversos estudios en humanos y modelos animales, demostraron que un flujo sanguíneo placentario adecuado es esencial para el crecimiento normal del feto. De este modo, las condiciones que afecten el crecimiento fetal, como el genotipo, el exceso o privación de nutrientes, el aumento en el número de fetos y el estrés ambiental, afectan el crecimiento de la placenta desencadenando la disminución del oxígeno fetal, la captación de nutrientes, de la angiogénesis y del flujo sanguíneo placentario (Vonnahme *et al.*, 2001, 2002; Anthony *et al.*, 2003; Wallace *et al.*, 2005; Reynolds *et al.*, 2006).

Para que el proceso de angiogénesis en la placenta se desarrolle de manera adecuada se necesita de un balance positivo entre mediadores químicos que promueven la angiogénesis, los factores proangiogénicos, y los factores antiangiogénicos (Ribatti, 2008). Dentro de los reguladores de la angiogénesis los de mayor importancia son el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y las angiopoyetinas (Ang) (Zygmunt et al., 2003).

Durante la angiogénesis se pueden diferenciar las siguientes etapas, vasodilatación e incremento de la permeabilidad vascular, degradación de la membrana basal por la activación de proteasas, incremento y proliferación de células endoteliales, ensamblaje de estas últimas para la formación de un túbulo permeable y selección de pericitos para la formación de vasos sanguíneos estables (Jain, 2003; Carmeliet, 2003; Cleaver y Melton, 2003). Mientras ocurre la maduración posterior de la red vascular, los capilares se unen formando vasos más grandes, las arterias y las venas. Durante este proceso, el plexo vascular se expande por medio de la ramificación capilar y se transforma en una red vascular bien organizada (Karamysheva, 2008).

ANGIOPOYETINAS

Las Ang son glicoproteínas que se segregan de manera autócrina por las células endoteliales y en forma parácrina por otras células del tejido. Asimismo, las Ang pueden regular la angiogénesis por medio de la activación o el bloqueo de su receptor Tie-2 (Gale y Yancopoulos, 1999; Valenzuela *et al.*, 1999, Regnault *et al.*, 2003).

El sistema Ang y el receptor Tie-2 juega un papel fundamental en la regulación de la supervivencia celular, la maduración y la estabilidad del endotelio vascular (Kappou *et al.*, 2015). Este sistema incluye cuatro ligandos (Ang-1, Ang-2, Ang-3 y Ang-4), siendo los mejores caracterizados, Ang-1 y Ang-2, con sus receptores tirosin quinasa correspondientes (Tie-1 y Tie-2). Estos factores actúan complementariamente al VEGF contribuyendo en las últimas etapas de la angiogénesis. Tanto Ang-1 como Ang-2 se unen a Tie-2, que es un receptor específico de las células endoteliales con una afinidad similar. Sin embargo, sus actividades biológicas difieren significativamente. La Ang-1 promueve la reorganización de las células endoteliales, la integridad estructural de los vasos sanguíneos mediante el reclutamiento y la interacción con las células peri-endoteliales (Augustin *et al.*, 2009). Además, potencia la función de

la barrera endotelial por medio del fortalecimiento de las adhesiones entre las células endoteliales (Fukuhara *et al.*, 2010). Durante el desarrollo vascular, controla el diámetro de los vasos, mientras que en el post-desarrollo, actúa como un inhibidor de la permeabilidad vascular y de la apoptosis endotelial, promoviendo la supervivencia vascular. En contraste, la Ang-2 actúa como un antagonista de la Ang-1, interrumpiendo las conexiones entre las células endoteliales y perivasculares, promoviendo la apoptosis y la regresión vascular, en presencia de bajos niveles del VEGF. Sin embargo, con niveles elevados del mismo, promueve la neovascularización (Scharpfenecker *et al.*, 2005, Augustin *et al.*, 2009).

Los efectos opuestos de la Ang-1 y la Ang-2 apoyan un modelo de interacciones constitutivas Ang-1/ Tie-2 que controlan la homeostasis vascular como vía predeterminada (Wong *et al.*, 1997) y la Ang-2 que actúa como una citoquina antagonizante dinámicamente regulada (Hnahan, 1997; Korff *et al.*, 2001; Carmeliet, 2003). Las interacciones de los ligandos de Ang con su receptor Tie-2 regulan la maduración vascular y además controlan la quiescencia del vaso (Davis *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 2001; Maisonpierre *et al.*, 1997). A su vez, el sistema Angiopoyetina/Tie participa en la desestabilización y remodelación vascular (Gale y Yancopoulos, 2000; Holash, 1999).

La Ang-1 se expresa principalmente en pericitos, fibroblastos y células del músculo liso (Davis *et al.*, 1996). Además, actúa de forma parácrina en las células endoteliales y se ha descrito como una molécula reguladora transcripcionalmente en algunos tumores (Stratmann *et al.*, 1998; Sugimachi *et al.*, 2003). Además, media la estabilización del vaso por medio del reclutamiento de las células periendotheliales (Suri *et al.*, 1996; Hanahan, 1997), sin embargo, la Ang-1 *per se* no estimula *in vitro* la proliferación o la formación de tubos de células endoteliales, aunque se la describió como estimuladora de la migración de células endoteliales (Witzenbicheler *et al.*, 1998). En presencia del VEGF, potencializa la base y el crecimiento de los capilares *in vitro* (Davis *et al.*, 1996; Papapetropoulos *et al.*, 1999).

La Ang-1 junto a la Ang-2 y el VEGF actúan de manera complementaria en el desarrollo y el mantenimiento vascular, pero la expresión de Ang-1 y Ang-2, junto con su regulación pueden ser críticas para el equilibrio entre la angiogénesis fisiológica y la patológica (Krikun *et al.*, 2000). En estudios *in vitro* se demostró que, en comparación con el VEGF, la Ang-1 es un pobre inductor de la proliferación de células endoteliales y de la formación de tubos (Davis *et al.*, 1996). Esta proteína actúa como “colaboradora” del VEGF en el proceso

angiogénico y es crítica para el desarrollo vascular embrionario. Hay evidencias que los embriones que carecen de la misma, exhiben defectos cardiovasculares y mueren (Patan, 1998; Hayes *et al.*, 1999; Thurston *et al.*, 1999; Holash *et al.*, 1999; Reynolds y Redmer, 2001). Los ratones deficientes en Ang-1 y Tie-2 presentan graves defectos de remodelación, una maduración y estabilización vascular defectuosa, lo que provoca la muerte embrionaria (Sato *et al.*, 1993; Davis *et al.*, 1996).

Se demostró que, aunque los niveles de Ang-1 no pueden ser regulados de forma activa, la capacidad del ligando para actuar con su receptor está estrechamente controlada, lo que permite que la señalización de Ang-1 este coordinada con otras señales en el microambiente celular (Singh *et al.*, 2011). La activación de Tie-2 mediada por la Ang-1 promueve el ensamblaje y la maduración de los vasos mediante la mediación de señales de supervivencia de las células endoteliales y estimula el reclutamiento de las células endoteliales (Davis *et al.*, 1996).

Durante la gestación, las Ang se producen principalmente en la placenta y desempeñan una función similar que en el resto de los tejidos (Kayisly *et al.*, 2006). Seval *et al.*, (2008) identificaron a Ang-1 y Ang-2 en diversas células hematopoyéticas presentes en los vasos sanguíneos. Basado en estudios *in vitro* sobre células hematopoyéticas y endoteliales, se evidenció que las Ang y Tie-2 pueden actuar como reguladores primordiales de la formación de progenitores hematopoyéticos y de células endoteliales, de manera sinérgica (Huang *et al.*, 1999). Asimismo, Ang-1 y Ang-2, están implicadas en la regulación del comportamiento del trofoblasto mediante distintos mecanismos para la promoción del crecimiento y migración del trofoblasto *in vitro* (Dunk *et al.*, 2000). Además, Tie-2 también se expresa en el trofoblasto participando en la regulación de su comportamiento. En humanos se demostró que existe una regulación positiva entre los niveles de Ang-2 y la disminución de Ang-1 en el suero materno en todo el marco gestacional (Bolin *et al.*, 2009). Por otro lado, en el primer trimestre de la gestación, se evaluó la relación Ang-1/Ang-2 y la asociación con resultados adversos (pequeño para la edad gestacional, parto prematuro, 10 semanas de gestación y muerte fetal) (Schneuer *et al.*, 2014). Los resultados obtenidos fueron bajos niveles de Ang-2 y una elevada relación Ang-1/Ang-2 se relacionó con un mayor riesgo de resultados adversos del embarazo (Akolekar *et al.*, 2009).

Dunk *et al.*, (2000) detectaron en placentas humanas una inmunocoloración intensa para Ang-1 en células aisladas dentro del mesénquima veloso y en el

estroma perivascular alrededor de los vasos sanguíneos de las vellosidades placentarias en el primer trimestre. Por otro lado, en las placentas a término, demostraron una intensa inmunocoloración en el núcleo del estroma fibroso y en el medio de los vasos sanguíneos maduros en las vellosidades primarias de la placenta. Sin embargo, no detectaron inmunocoloración de Ang-1 en las vellosidades terminales de la placenta a término. Además en este estudio se evidenció una co-localización de Ang-1, Ang-2 y Tie-2 en el trofoblasto (Dunk *et al.*, 2000). Asimismo, Goldman-Wohl *et al.*, (2000) demostraron la localización de Ang-1 y Tie-2 en placentas humanas.

Si bien existen algunos trabajos sobre el rol que desempeñan las Ang y su receptor en las placentas de animales domésticos, actualmente no se encuentra bibliografía disponible respecto a su localización y su funcionalidad en placentas caprinas a lo largo de la gestación.

HIPÓTESIS

- ✓ Durante el último tercio de la gestación se produce un incremento del desarrollo vascular en la placenta caprina, como consecuencia de una mayor expresión de Angiopoyetina-1 y su receptor Tie-2.

OBJETIVOS

Objetivo general

- ✓ Conocer la expresión de factores angiogénicos en placentas de cabras en diferentes estadios de gestación.

Objetivos específicos

- ✓ Describir la morfología de la placenta caprina utilizando técnicas histológicas convencionales a los 50, 100 y 135 días de gestación.
- ✓ Determinar la expresión del sistema Angiopoyetina-1/Tie-2 a través de técnicas inmunohistoquímica en placentas caprinas en los diferentes estadios gestacionales estudiados.

MATERIALES Y METODOS

MURA, NADYA MICAELA

TOMA DE MUESTRAS

El experimento se realizó en las instalaciones de la Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC), Córdoba, Argentina. Se utilizaron 15 cabras adultas mayores de 2 años; libres de enfermedades infecciosas, destinadas a faena, provenientes de un establecimiento ubicado a 10 km de la UNRC (33°7' S, 64°,13' O). Los animales permanecieron en corrales con piso de concreto (6m x 3m) con un espacio cubierto para facilitar la protección durante el descanso nocturno. El alimento fue entregado dos veces por día teniendo acceso al agua ad libitum.

Se realizó la detección del celo por observación directa 1 vez por día durante la mañana antes de la entrega de alimento. Luego de comprobar la ciclicidad de las hembras se realizó el servicio por monta natural. El diagnóstico de gestación se realizó a los 25-30 días posteriores al servicio, utilizando un ecógrafo Berger®, modo B, de tiempo completo, provisto de un transductor lineal transrectal de 7.5 Mhz.

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Los úteros grávidos fueron obtenidos de hembras de 50, 100 y 135 días de gestación (n=5) por cada día. Cada cuerno uterino fue incidido a lo largo del borde antimesometrial y los fetos fueron removidos. Se extrajeron diez placentomas de cada uno de los úteros y se fijaron en formol buffer fosfato pH 7.5, se deshidrataron, se incluyeron en parafina y se realizaron cortes histológicos de \pm 4-5 μ m. Parte de los cortes se colorearon con hematoxilina-eosina (H/E).

Mediante la técnica inmunohistoquímica de avidina-estreptavidina-peroxidasa y los anticuerpos Anti Ang-1 y Anti Tie-2 se evidenció la presencia y localización de Ang-1, y Tie 2.

Los cortes fueron observados con un microscopio óptico Axiophot (Carl Zeiss, Alemania), la adquisición de las imágenes se realizó con una cámara digital Powershot G6, 7.1 megapixels (Canon INC, Japón) adosada al microscopio y el procesamiento de las mismas a través del software AxioVisionRelease 4.6.3 (Carl Zeiss, Alemania).

COLORACIÓN DE HEMATOXILINA-EOSINA

Para la realización de esta técnica se prepararon las siguientes soluciones:

Para la tinción con hematoxilina se utilizó una solución stock compuesta por 10% de hematoxilina en 95% de etanol absoluto, 4% de alumbre de sodio y 0,1% de IO_3Na ; y una solución de trabajo compuesta por 1 ml de la solución stock de hematoxilina, 40 ml de alumbre de sodio, 4,5 ml de IO_3Na y 100 ml de agua destilada.

Para la preparación de la eosina se utilizó una solución stock compuesta por 1 g de eosina y 99 ml de etanol 70%; y una solución de trabajo compuesta por 1 ml de solución stock y 15 ml de agua destilada.

Para la realización de esta técnica los portaobjetos se colorearon con hematoxilina por 1,5 min y se lavó con agua corriente. Luego se colorearon con eosina por 1 min y se lavaron nuevamente con agua corriente. Por último, se realizó la deshidratación y el montaje definitivo para luego ser observados al microscopio óptico.

Con esta técnica, la cromatina nuclear y otros compuestos basófilos se colorean de azul, mientras que citoplasma, el colágeno y otros compuestos acidófilos se observan rosados.

TÉCNICA INMUNOHIUSTOQUÍMICA PARA LA DETERMINACION DE ANG-1

Se trabajó con cortes montados sobre portaobjetos gelatinizados, se colocaron los portaobjetos en la estufa por 15 min y se dejaron enfriar 10 min. Luego se realizó la desparafinación y rehidratación: 2 pasajes en xilol 100 %, 1 pasaje en alcohol/xilol, 1 pasaje en alcoholes de graduación decreciente (100 %, 95% 70%) de 10 min cada uno. Posteriormente, se colocaron los portaobjetos en un coplin de plástico con tapa perforada al que se le agregó buffer citrato 10mm pH:6 (Dako Target retrival solution citrate pH6 saramé) 10ml: 90 ml de H_2O destilada. Se colocaron a baño maría en microondas por 10 min a potencia 600 W y se controló cada 2 min el nivel de buffer citrato y cuando fue necesario se fue restituyendo su cantidad para que siempre quedaran los preparados bañados con el mismo, por último se dejó enfriar 20 min. Luego se realizaron 2 enjuagues con PBS, de 10 min cada uno y se les agrego peróxido de hidrógeno 3% (15 mm H_2O_2) en PBS (35mm) y se lo dejó actuar 20 min. Se realizó un lavado con PBS por 3 min y se dejó escurrir. Se agregó suero normal de caballo y se lo incubó en cámara húmeda por 30 min, sin lavar se le agregó el primer anticuerpo (Anti Ang-1 Santa Cruz biotechnology Inc. USA) 1/50, se cubrió con

parafilm, y se incubó toda la noche en cámara húmeda. Posteriormente se realizaron 2 lavados de PBS de 10 min cada uno y se escurrió. Se agregó el segundo anticuerpo biotilado (Kit cell marque), se cubrió con parafilm y se los incubó por 30 min. Se realizaron 2 lavados con PBS de 10 min cada uno, se los escurrió y se agregó estreptavidina conjugada con peroxidasa (Kit Cell Marque) y se los dejó incubar por 30 min cubiertos con parafilm. Se hicieron 4 lavados de PBS de 5 min cada uno y se los incubó con solución cromógena de Diaminobencidina (DAB) preparada con 20 microlitros (1 gota) DAB CROMOGEN con 1 ml. del buffer. Apenas viró al color marrón se cortó la reacción con agua destilada. Se contrastó con hematoxilina de Mayer por 45 seg, se viró con agua corriente y se corroboró la coloración al microscopio óptico. Por último, se realizó la deshidratación y el montaje definitivo.

TÉCNICA INMUNOHIUSTOQUÍMICA PARA LA DETERMINACION DEL RECEPTOR TIE-2

Se trabajó con cortes montados sobre portaobjetos gelatinizados. Se realizó la desparafinación y rehidratación tal como se detalló para la técnica inmunohistoquímica para la determinación de Ang-1. Se realizaron 2 lavados de PBS más tritón (100ml de PBS + 1ml de tritón), de 10 min cada uno. Se colocaron los portaobjetos en coplin de plástico con tapa perforada y llenos con buffer citrato 10mm pH: 6 (Dako Target retrival solution citrate pH6 (saramé)). Se colocaron a baño maría en microondas 10 min a potencia 600 W, se controló cada 2 min, se restituyó el buffer y se dejó enfriar 20 min. Se realizaron 2 enjuagues con PBS más tritón, de 10 min cada uno. Se les agregó peróxido de hidrógeno 3% (15 mm H₂O₂ en PBS 35mm) y se lo dejó actuar por 20 min, se lavó con PBS por 3 min y se escurrió. Se les agregó suero normal de caballo y se los incubó en cámara húmeda por 30 min. Sin lavar, se agregó el primer anticuerpo (Anti Ang-1 Santa Cruz Biotechnology)1/50 se cubrió con parafilm y se incubó toda la noche en cámara húmeda. Luego se realizaron 2 lavados de PBS 10 min cada uno y se escurrió. Se agregó el segundo anticuerpo biotilado (Kit cell marque), se cubrió con parafilm e incubó por 30 min. Se realizaron 2 lavados de PBS de 10 min cada uno y se escurrió. Se agregaron gotas de estreptavidina conjugada con peroxidasa (Kit Cell Marque). Se cubrió con parafilm e incubó por 30 min. Se hicieron 4 lavados de PBS de 5 min cada uno, se incubó con solución cromógena (DAB), se contrastó con hematoxilina de Mayer por 45 seg., se deshidrató y se realizó el montaje definitivo.

SEMICUANTIFICACIÓN DE LA INMUNOMARCACIÓN

Para la cuantificación de Ang-1 se evaluaron 5 campos al azar del tejido placentario por animal, con un microscopio a 200 X de magnificación. Los resultados obtenidos se expresaron en forma semicuantitativa, en función de una escala elegida por la intensidad de marcación detectada en la técnica, determinando que: (-): negativo, (+): débil, (++) : moderado, (+++) : intensa. Por otra parte, se determinó la distribución de la intensidad de marcación por medio del valor High Score obtenido a través de la sumatoria de los porcentajes de tejido placentario marcados a cada nivel de intensidad y multiplicado por el ponderado para esa intensidad de marcación (Cristofolini y col., 2010) de la siguiente manera: $HS: \sum P_i (i + 1)$

dónde: i: intensidad de marcación

P_i : porcentaje de células para cada intensidad de marcación

Los valores fueron determinados por dos investigadores a diferentes tiempos y se calculó su promedio y luego se realizó un análisis de ANOVA con el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2009) para evaluar la dependencia de Ang 1 en relación al estadio gestacional, usando un diseño completamente al azar.

Para Tie-2 se realizó una evaluación cualitativa para demostrar su localización en el tejido placentario en cada edad gestacional.

RESULTADOS

MURA, NADYA MICAELA

DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE PLACENTAS CAPRINAS

Mediante la microscopia óptica se estudiaron las placentas caprinas de 50, 100 y 135 días de gestación, las cuales mostraron ser diferentes y se observó que a medida que la gestación progresa, las placentas cuentan con una estructura más desarrollada y compleja.

Se observó que el tejido caruncular, en todos los periodos analizados, emite tabiques que se proyectan hacia el tejido fetal y forma criptas que están invadidas por vellosidades fetales. Estos tabiques se van ramificando, lo que da como resultado un aumento de la superficie de contacto con el tejido cotiledonario.(Figura 1 A₁, B₁ Y C₁). A diferencia de los dos primeros periodos, a los 135 días, se observó que hay escaso tejido conectivo materno con presencia de vasos sanguíneos que irrigan al mismo (Figura 1C). Esta disminución del tejido conectivo hace que los tabiques del tejido caruncular tengan apariencia de ser más delgados.

En los periodos gestacionales estudiados, el epitelio materno, que está ubicado en contacto con el epitelio fetal, es delgado y la conformación del mismo está dada por células mononucleadas intercaladas con células multinucleadas. Las primeras son de forma cúbica y cuentan con un núcleo de color claro, en cambio, las células multinucleadas, también llamadas sincitios, son planas, presentan un número variado de núcleos y cuentan con muy poco citoplasma (Figura 1 A₂, B₂ Y C₂).

Con respecto al tejido conectivo, se observó que en el mismo están presentes los vasos sanguíneos, los cuales son de diferente tamaño y que están irrigando a todo este tejido (Figura 1 A, B Y C).

El epitelio fetal o cotiledonario, es de apariencia pseudoestratificado y está conformado por células mononucleadas (CMN) que se intercalan con células binucleadas (CBN), las cuales están presentes en menor cantidad y se disponen a diferente profundidad y altura. Las primeras, son de forma columnar altas en las bases de las vellosidades fetales, y se van haciendo cubicas en el resto de la vellosidad. Las CMN contienen un núcleo de gran tamaño y su citoplasma es de color claro. La base de estas células se apoya sobre la membrana basal, mientras que su parte apical está en contacto con la zona en la que se unen la parte materna con la fetal. Además, se observaron algunos capilares que se invaginan en la cara basal de las mismas (Figura 1 A₂ y B₂).

Las CBN son células de gran tamaño, de forma redondeada, contiene dos núcleos de gran tamaño y son de color claro. Además, se observó que su citoplasma se tiñe de color más oscuro que el de las CMN que se encuentran adyacentes a las mismas. Estas células no se distribuyen uniformemente, algunas están ubicadas hacia la superficie del tejido y salen hacia el lado materno, mientras que hay otras que no contactan con la membrana basal y se ubican en la profundidad del epitelio fetal. También se identificaron algunas células que se encuentran sueltas en la zona de unión de la parte materna con la fetal (Figura 1 A₂, B₂ Y C₂).

Se identificó una variación en el color de las CBN, las cuales eran más claras hacia la membrana basal y más oscuras las que se encontraban próximas al epitelio materno. Estas células fueron observadas en todos los periodos gestacionales estudiados.

En placentas de 135 días de gestación, se observó que el epitelio cotiledonario en la base de las vellosidades es cúbico alto pseudoestratificado, compuesto por CMN y CBN en escasa cantidad. Además, se observaron glóbulos rojos en su interior. A medida que va avanzando hacia la parte materna este epitelio se ramifica y se transforma en un epitelio cúbico bajo que cuenta con una mayor cantidad de CBN a distinta altura o que están en la interfase materno-fetal (Figura 1 C₂).

En cuanto al tejido conectivo, el mismo es laxo en el origen de las vellosidades y este además contiene una gran cantidad de vasos sanguíneos que son de gran calibre. Este tejido disminuye en las vellosidades secundarias y terciarias hasta que parece desaparecer, y los vasos sanguíneos en las mismas disminuyen su diámetro para formar capilares pequeños ubicados en contacto con la membrana basal (Figura 1 C₁).

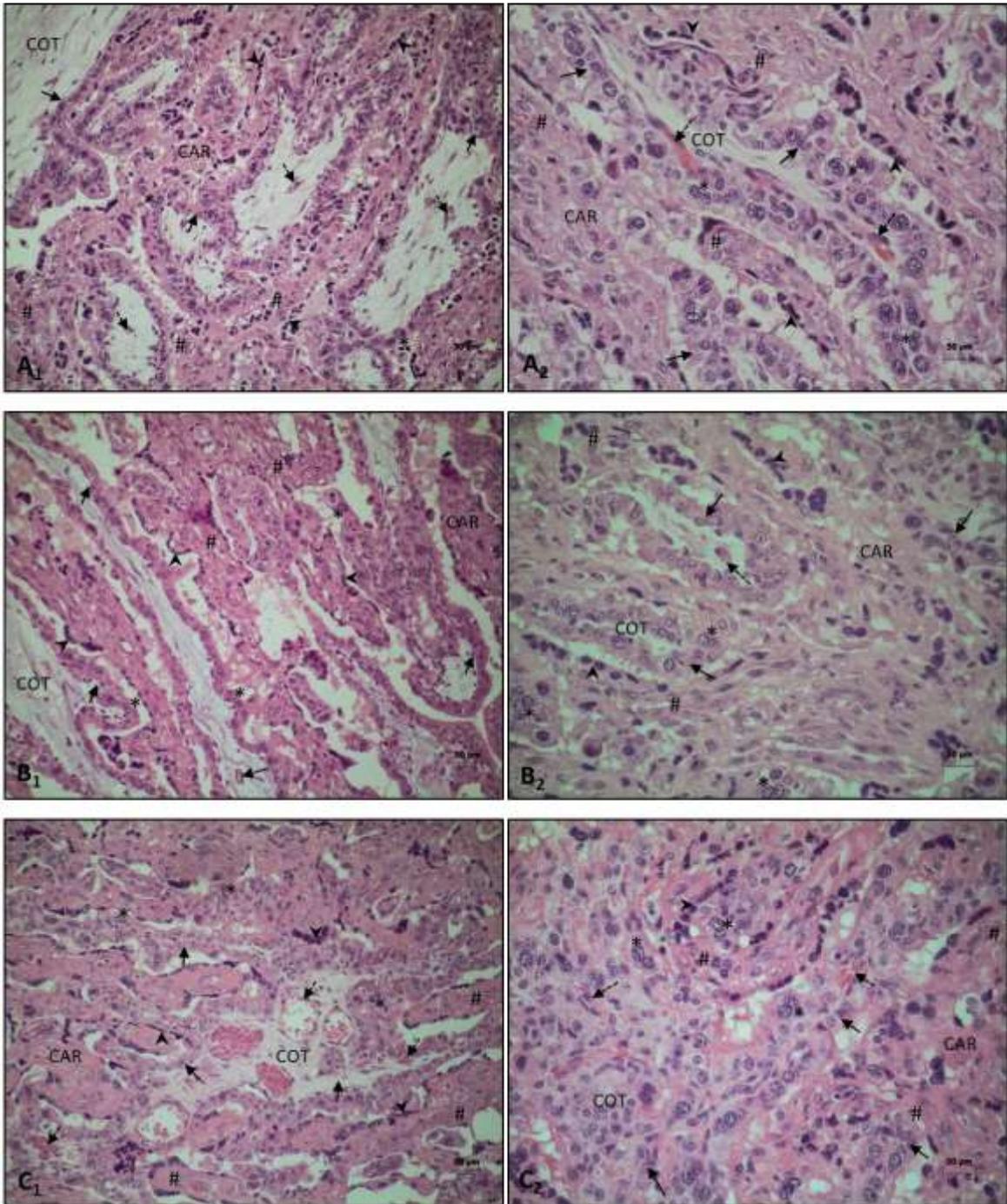


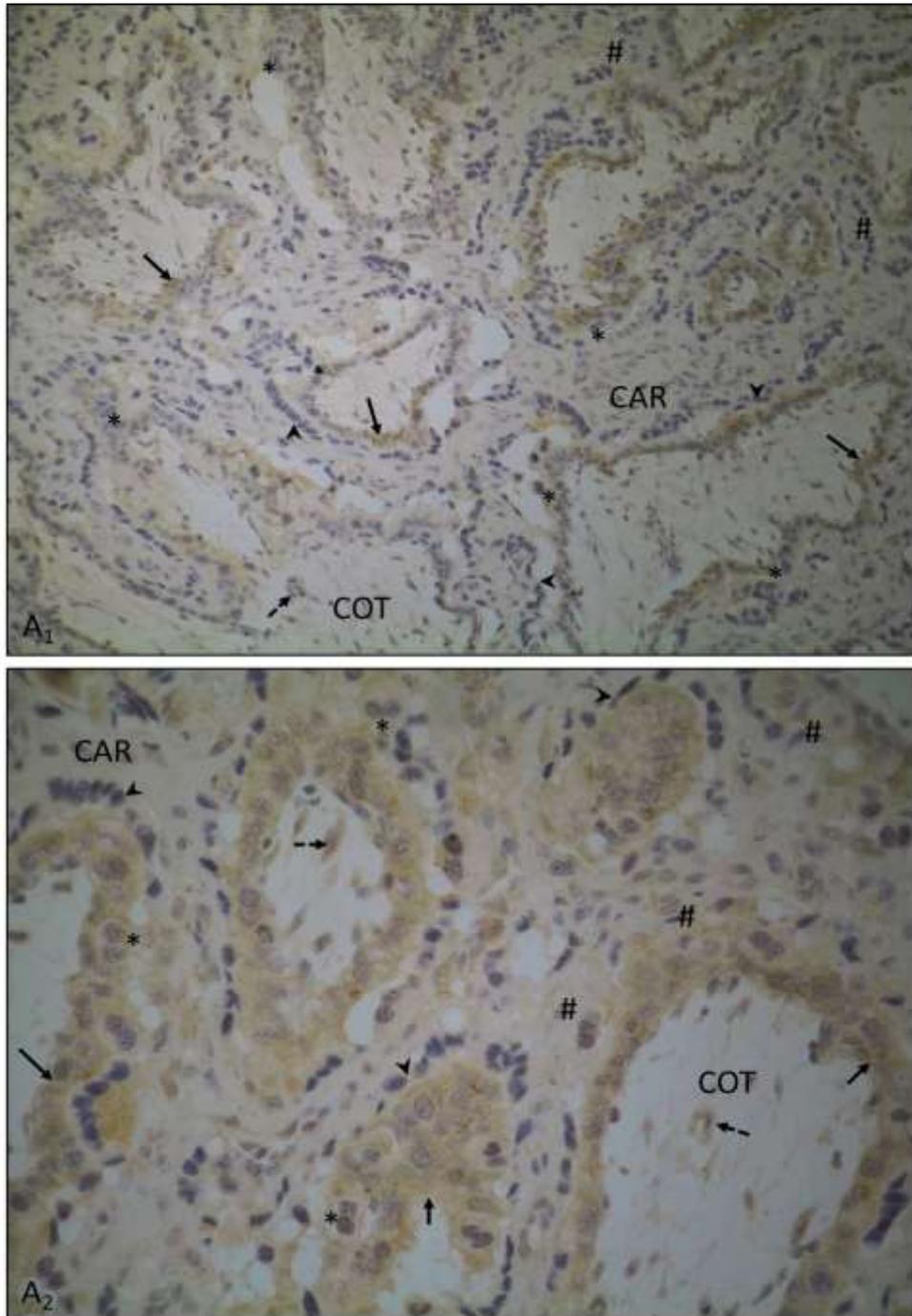
Figura N°1: Microscopia óptica H/E de placentas caprinas. A: 50 días de gestación B: 100 días de gestación. C: 135 días de gestación. A1, B1 Y C1: 200X. A2, B2 Y C2: 400X
 COT: cotiledón; CAR: carúncula; flecha continua: epitelio trofoblástico; cabeza de flecha: epitelio materno, flecha entrecortada: capilares fetales; #: capilares maternos, * CBN.

INMUNOLOCALIZACIÓN DE ANGIOPOYETINA 1 (ANG-1)

En todas las muestras placentarias analizadas la inmunomarcación para la proteína Ang-1 fue citoplasmática. En las placentas de 50 y 100 días de gestación se observó una inmunomarcación intensa en el epitelio trofoblástico, en contraste con las placas sincitiales del epitelio materno cuya inmunomarcación fue débil. En las células binucleadas se observó una coloración de poca intensidad en comparación con el resto del epitelio fetal. En los endotelios de los capilares maternos y fetales se encontró una moderada inmunoreacción (Figura 2 y 3).

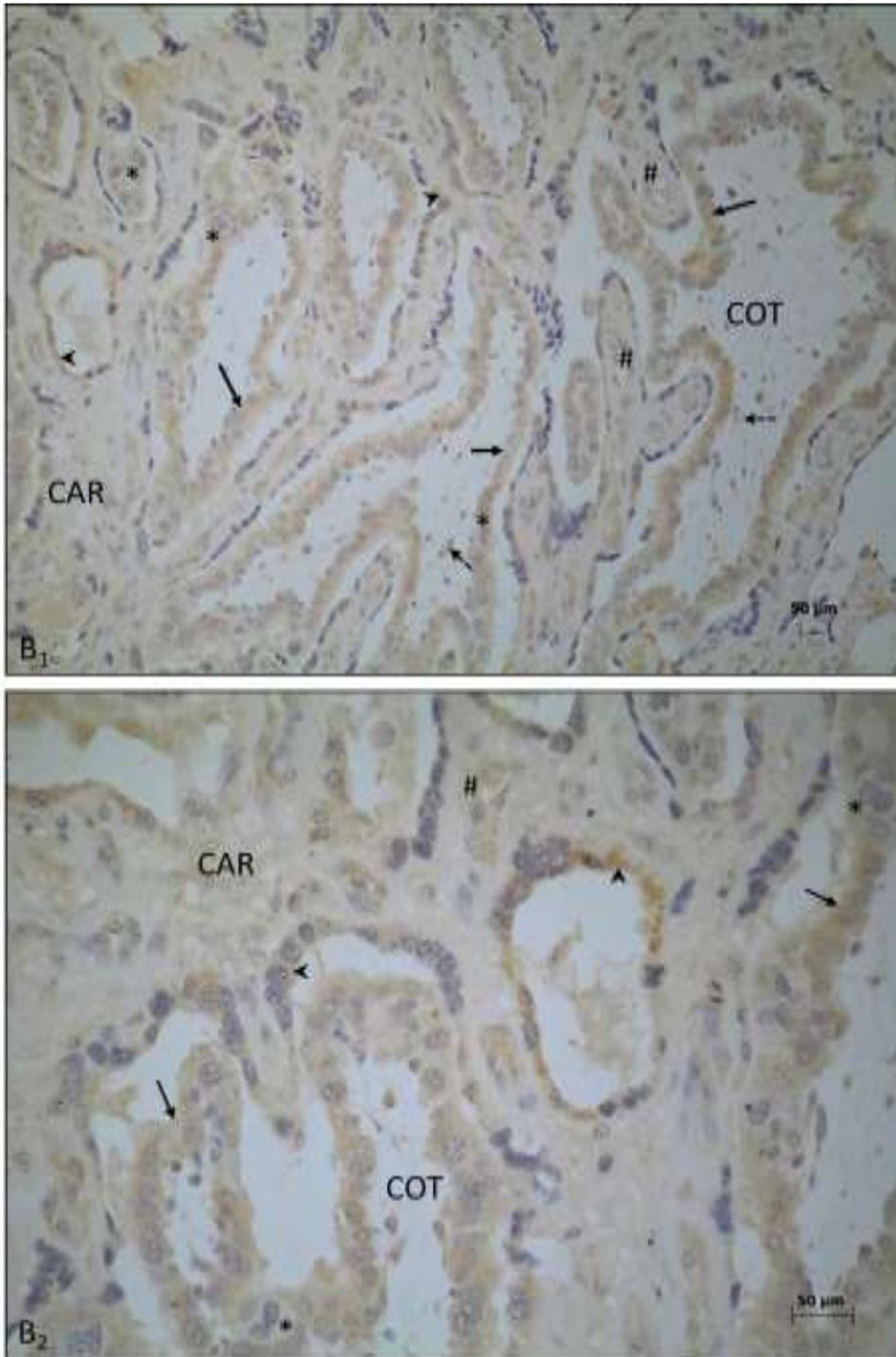
A los 135 días de gestación se evidenció que a medida que las vellosidades maduran y se ramifican en el tejido materno, la intensidad de inmunoreacción del epitelio trofoblástico se atenúa hasta que desaparece y se conserva una intensa coloración en la base de las vellosidades. En el tejido materno el citoplasma de las placas sincitiales y de las células mononucleadas se inmunomarcaron intensamente. En las células endoteliales fetales y maternas, no se observó una inmunoreacción para Ang-1 (Figura 4).

El análisis de HSCORE para Ang-1 demostró que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en la intensidad de inmunomarcación entre los diferentes periodos de gestación analizados en placentas caprinas (Figura 5).



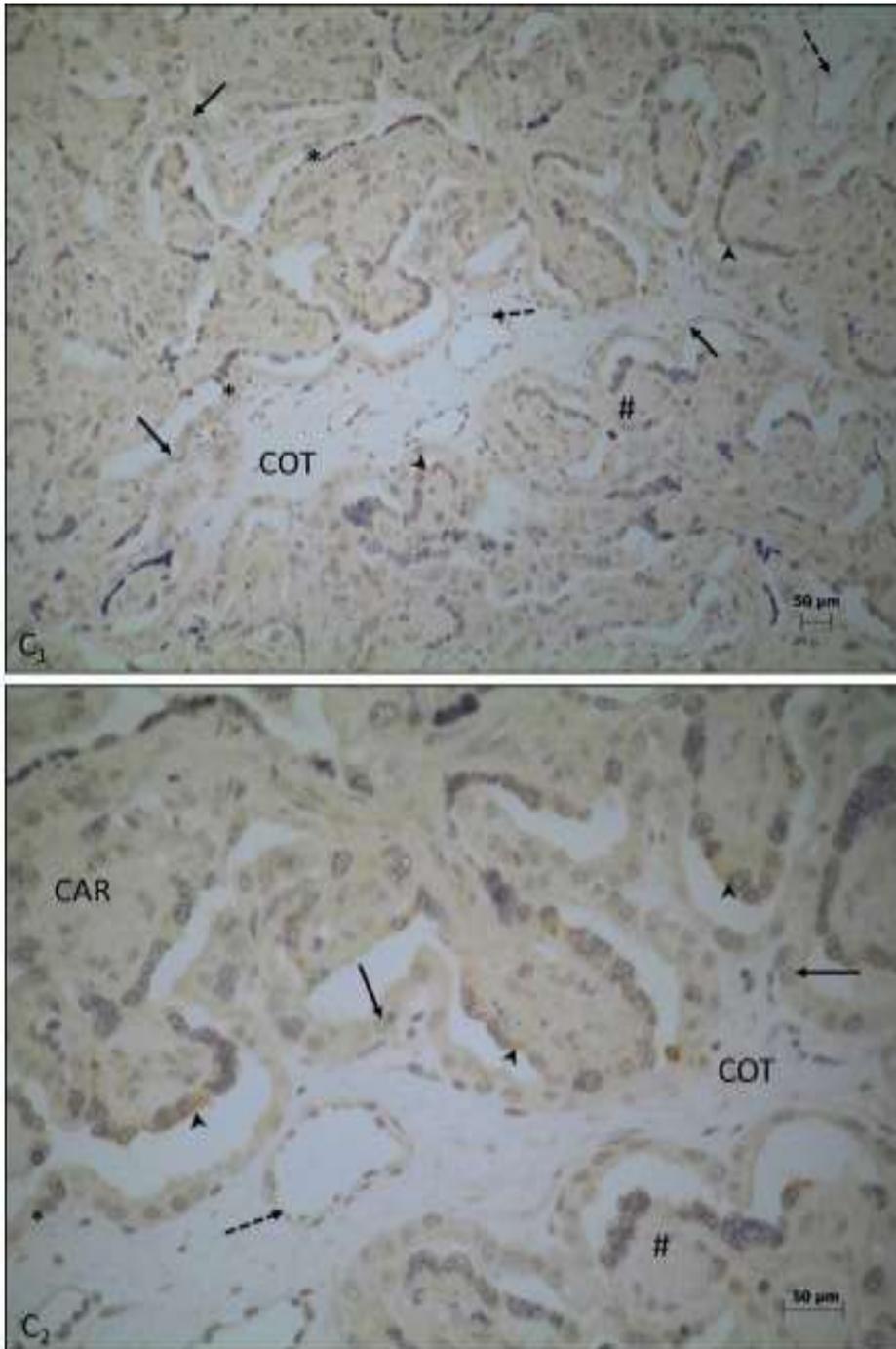
**Figura 2: Inmunolocalización de Ang-1 en placentas de 50 días de gestación.
A₁:200X Y A₂:400X**

COT: cotiledón; CAR: carúncula; flecha continua: epitelio trofoblástico; cabeza de flecha: epitelio materno; flecha entrecortada: capilares fetales; #: capilares maternos, * CBN



**Figura 3: Inmunolocalización de Ang-1 en placentas de 100 días de gestación.
B₁:200X Y B₂:400X**

COT: cotiledón; CAR: carúncula; flecha continua: epitelio trofoblástico; cabeza de flecha: epitelio materno; flecha entrecortada: capilares fetales; #: capilares maternos, * CBN.



**Figura 4: Inmunolocalización de Ang-1 en placentas de 135 días de gestación.
C₁:200X Y C₂:400X**

COT: cotiledón; CAR: carúncula; flecha continua: epitelio trofoblástico; cabeza de flecha: epitelio materno; flecha entrecortada: capilares fetales; #: capilares maternos, * CBN.

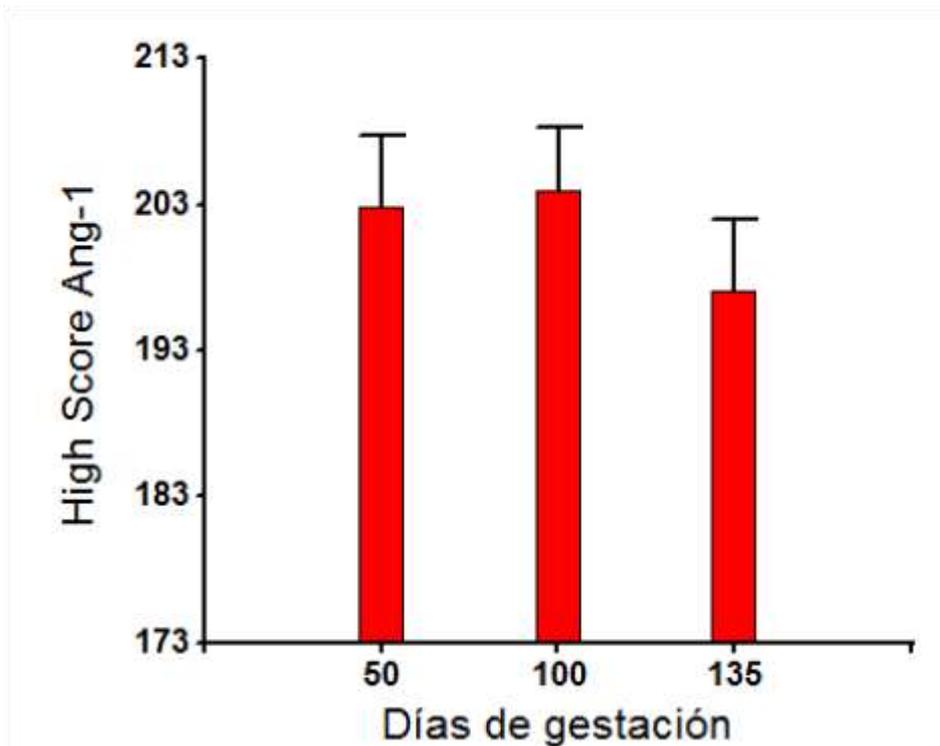


Figura 5: HSCORE de técnica inmunohistoquímica de Ang-1 en placenta de cabras gestantes. Las columnas representan la media +/- EE

INMUNOLocalización DEL RECEPTOR TIE-2

En las placentas analizadas, se detectó un patrón citoplasmático de coloración para la inmunomarcación del receptor Tie-2. En las células endoteliales de los capilares fetales y maternos como en las células del epitelio trofoblástico de todos los periodos analizados se observó una moderada inmunoreacción. Por otro lado, en el epitelio endometrial a los 135 días de gestación se evidenció una débil inmunoreacción (Figuras 6,7 y 8).

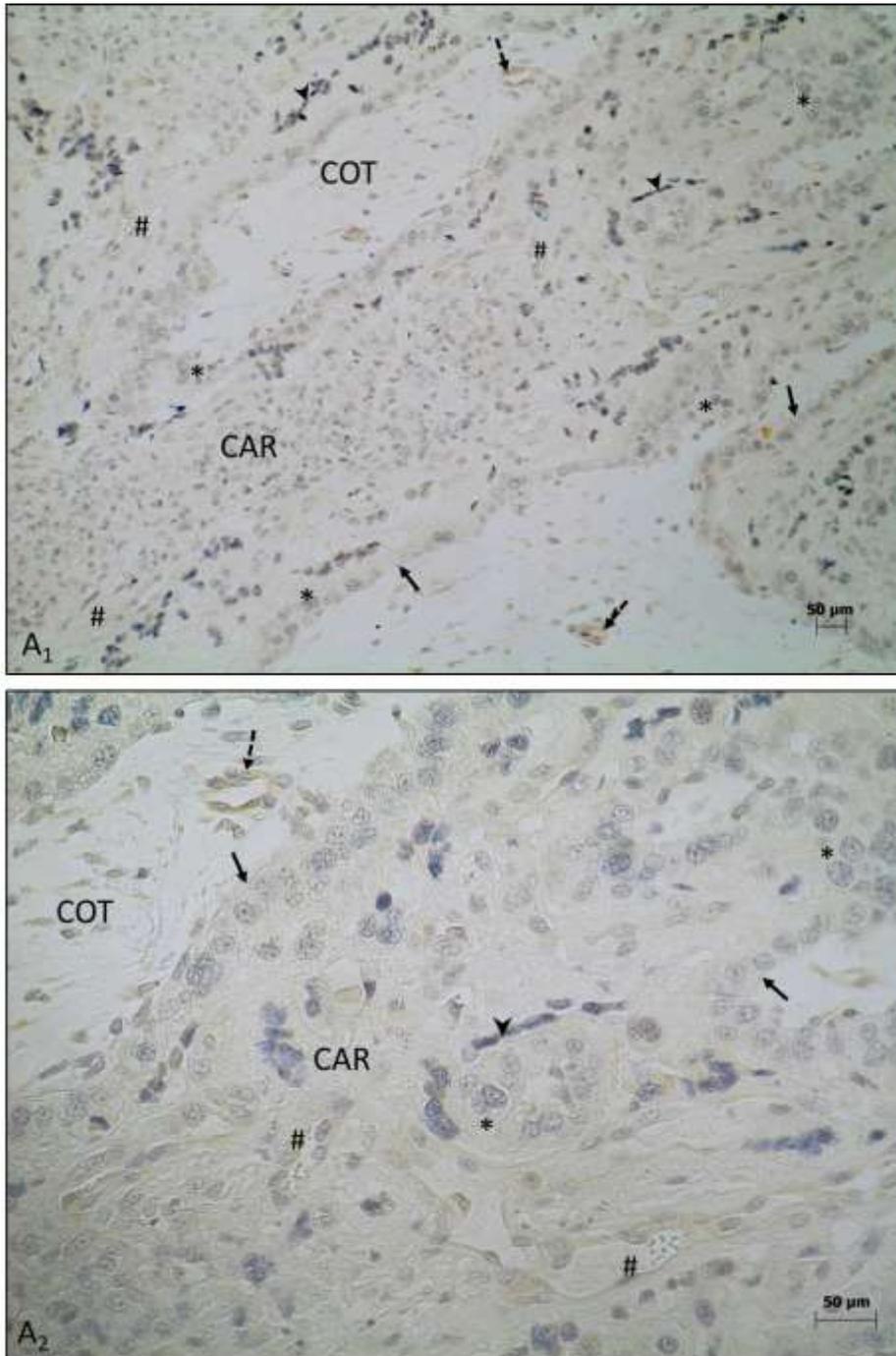
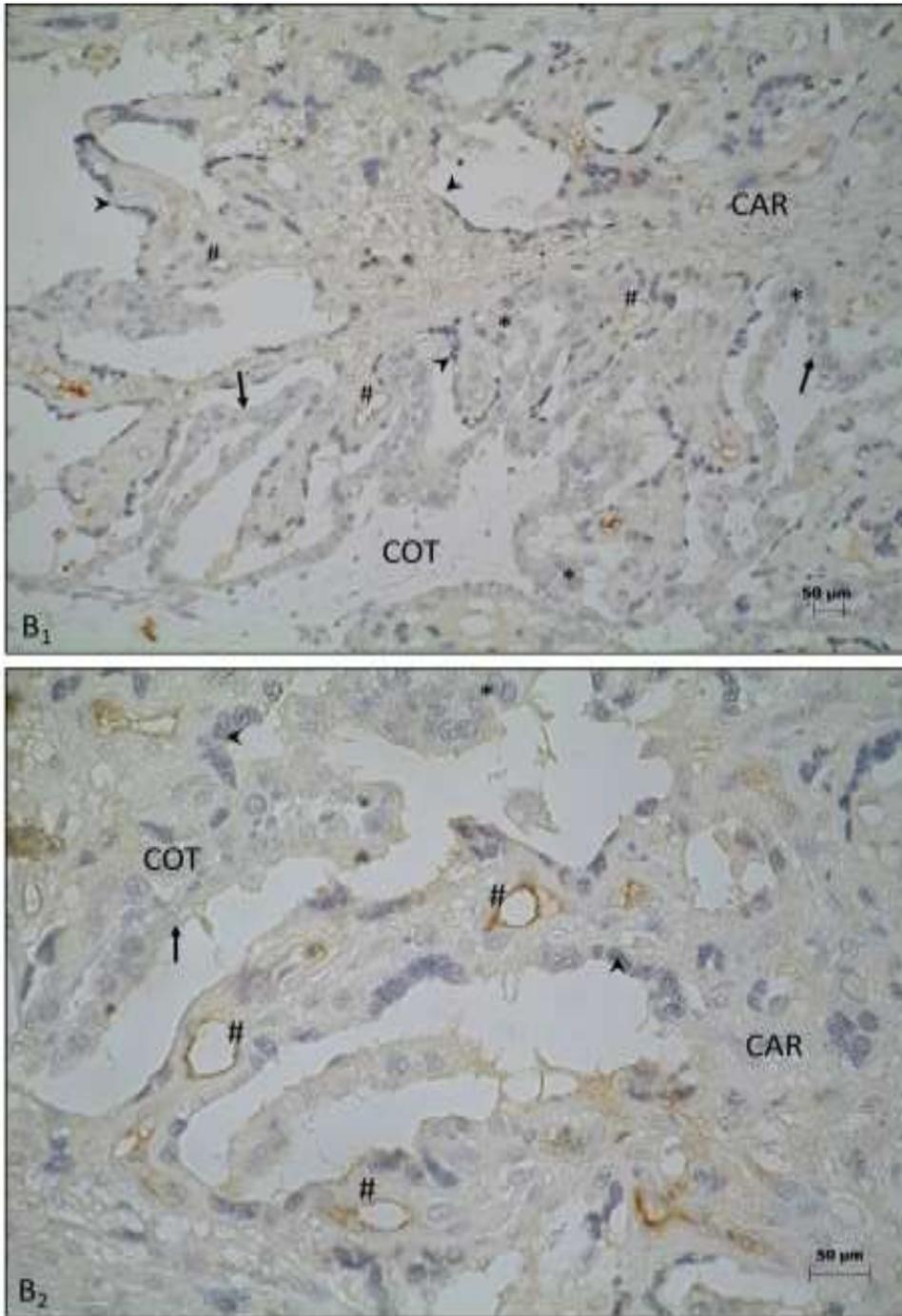


Figura N°6: Inmunolocalización de Tie-2 en placentas de 50 días de gestación.

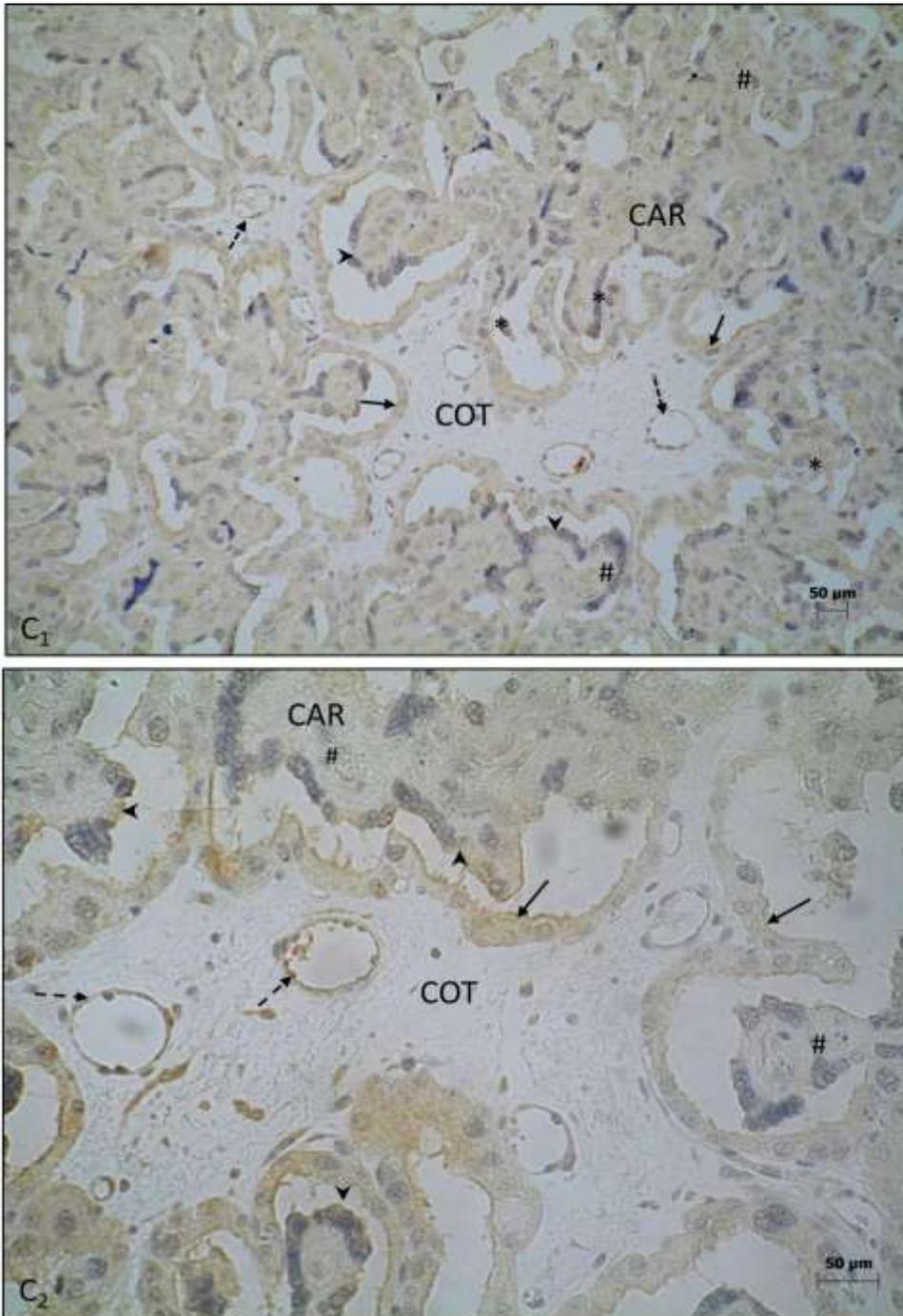
A₁: 200X Y A₂:400X

COT: cotiledón; CAR: carúncula; flecha continua: epitelio trofoblástico; cabeza de flecha: epitelio materno; flecha entrecortada: capilares fetales; #: capilares maternos, * CBN



**Figura N°7: Inmunolocalización de Tie-2 en placentas de 100 días de gestación.
B₁: 200X Y B₂:400X**

COT: cotiledón; CAR: carúncula; flecha continua: epitelio trofoblástico; cabeza de flecha: epitelio materno; flecha entrecortada: capilares fetales; #: capilares maternos, * CBN.



**Figura N°8: Inmunolocalización de Tie-2 en placentas de 135 días de gestación.
C₁: 200X Y C₂:400X**

COT: cotiledón; CAR: carúncula; flecha continua: epitelio trofoblástico; cabeza de flecha: epitelio materno; flecha entrecortada: capilares fetales; #: capilares maternos, * CBN.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

MURA, NADYA MICAELA

La placenta posee una organización estructural que le posibilita lograr un eficiente intercambio entre los tejidos de la madre y el feto para optimizar el crecimiento y el desarrollo fetal (Peninga y Longo, 1998). Por medio de la microscopia óptica pudimos evidenciar que la estructura placentaria caprina concuerda con lo descrito para los rumiantes. Asimismo, la conformación del epitelio trofoblástico observada es concordante con lo descrito por Igwebuike y Ezeasor (2012) quienes lo describen como pseudoestratificado y constituido por dos tipos de células, mononucleadas y binucleadas. A medida que avanza el tiempo gestacional, la placenta adquiere una estructura más compleja, con interdigitalización de los tejidos maternos y fetales. Las vellosidades cada vez más ramificadas van invadiendo al tejido materno con disminución del tejido conectivo, lo que podría ocasionar que el intercambio de nutrientes, gases, y otras moléculas sea más eficiente ya que mejora el contacto de los vasos sanguíneos con el epitelio trofoblástico. También observamos que el tejido conectivo de los tabiques maternos disminuye, lo que conduce a que los vasos maternos estén más cerca de la parte fetal y se favorezca el intercambio al satisfacer las altas demandas metabólicas del feto. Además, nuestros resultados concuerdan con Santos *et al.*, (1998) quienes también evidenciaron una disminución del tejido conectivo de las vellosidades fetales relacionado con la mayor ramificación de las mismas en el último tercio de gestación en las placentas caprinas. Estos autores sostienen que la disminución del tejido conectivo permite un mayor desarrollo vascular y a su vez prepara a la placenta para ser expulsada en el momento del parto. En este sentido, para que la placenta pueda desempeñar su papel en el intercambio, se necesita una red vascular apropiada que surge de los procesos de vasculogénesis y angiogénesis (Reynolds *et al.*, 2005).

En nuestro estudio, la inmunomarcación de la proteína Ang-1 se evidenció con una intensa inmunomarcación en el epitelio del citotrofoblasto y del sincitrofoblasto durante los dos primeros períodos de gestación analizados. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Seval *et al.* (2008) quienes demostraron la localización de Ang-1 en placentas humanas con una marcación intensa tanto en el citotrofoblasto como en el sincitiotrofoblasto durante el primer tercio de la gestación. En cuanto a las células endoteliales, ellos demostraron una débil coloración, mientras que nosotros observamos una moderada marcación tanto en el endotelio fetal como en el materno, mientras que en las células binucleadas presentaron una escasa coloración. Del mismo

modo, Goldman-Woh *et al.*, 2000, demostraron que la Ang-1 se expresa en el sincitiotrofoblasto en la placenta humana durante el primer trimestre.

En el transcurso de la gestación, la inmunohistoquímica para Ang-1 mostró variaciones en cuanto a la localización y a la intensidad de inmunomarcación. Hacia el final de la misma no se observó marcación en las células endoteliales maternas ni fetales, y la intensidad de la inmunomarcación del epitelio trofoblástico disminuyó. Contrariamente, en el sincitio materno se observó una intensa marcación. Este cambio en el patrón de inmunolocalización de Ang-1 indicaría su importancia en la promoción de la maduración vascular y en la estabilización de los vasos maternos. Algunos autores evidenciaron que, a lo largo de la gestación, la expresión de la Ang-1 se incrementó, mientras que Ang-2 y Tie-2 disminuyeron (Zhang *et al.*, 2001; Geva *et al.*, 2002). En contraste con estos resultados, nosotros no encontramos diferencias significativas mediante HSCORE, para la expresión de Ang-1 a lo largo de la gestación, lo que difiere con la hipótesis de trabajo planteada.

Con respecto a Tie-2, Dunk *et al.* (2000) demostraron que se encuentra en el trofoblasto y se expresa en el sincitiotrofoblasto de las vellosidades placentarias a término, lo que indicaría que actúa regulando su comportamiento. Además, estos autores demostraron durante el primer trimestre de la gestación en humanos, una co-localización de Ang-1, Ang-2 y Tie-2 en el trofoblasto, lo que sugiere que las Ang pueden desempeñar un papel autócrino en la función del trofoblasto. Asimismo, Goldman-Woh *et al.*, (2000) demostraron que Tie-2 actúa en el desarrollo vascular dado que se expresa en el endotelio de los vasos tanto maternos como fetales. Con respecto a la intensidad de inmunomarcación, Seval *et al.* (2008) evidenciaron en la placenta humana una inmunomarcación más intensa en el citotrofoblasto, en las células angiogénicas y endoteliales, mientras que no encontraron cambios significativos en la intensidad en la gestación avanzada. Esto no concuerda con nuestros resultados ya que la inmunomarcación fue moderada en el epitelio trofoblástico, en los endotelios de los capilares maternos y fetales en los dos primeros períodos gestacionales estudiados. Esta diferencia podría obedecer a un patrón de inmunomarcación y de intensidad propia de la especie caprina.

Dunk *et al.* (2000), observaron una intensa inmunocoloración en los vasos sanguíneos de placentas humanas. En nuestro estudio determinamos una débil inmunocoloración en el epitelio endometrial comparada con el resto de los tejidos donde no se evidenció coloración, en contraste con los resultados obtenidos por Seval *et al.* (2008).

Estudios en placentas ovinas (Reynolds *et al.*, 2005) permitieron identificar la importancia de Ang-1 y 2 y su receptor Tie-2, que al actuar en forma conjunta con el VEGF y el FGF, permiten la remodelación, la organización microvascular y la sobrevivencia de las células endoteliales. Esto evidencia que el sistema Ang-1/Tie-2 junto con el VEGF, actuarían de forma autócrina y parácrina en el proceso de angiogénesis para garantizar el desarrollo de la vasculatura placentaria durante los distintos períodos estudiados de la gestación en cabras. La alteración de la angiogénesis afecta la expresión de distintos factores angiogénicos que producen una reducción del flujo sanguíneo, como ocurre en varios desórdenes gestacionales como la muerte embrionaria intrauterina temprana, la preeclamsia, el crecimiento intrauterino restringido y la diabetes, entre otras (Shimizue *et al.* 2012).

Esta investigación pretende contribuir a elucidar los mecanismos que regulan los procesos involucrados en el desarrollo de la vascularización placentaria para lograr un buen crecimiento fetal y un óptimo peso de la cría al nacer y así optimizar la producción caprina teniendo en cuenta el contexto social donde se desarrolla.

BIBLIOGRAFÍA

MURA, NADYA MICAELA

- **Adams R.H. & K. Alitalo** (2007). Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:464-478.
- **Akolekar R., D. Casagrandi, E. Skyfta, A.A. Ahmed & K.H. Nicolaides** (2009). Maternal serum angiopoietin-2 at 11 to 13 weeks of gestation in hypertensive disorders of pregnancy. *Prenat. Diagn.* 29: 847-851.
- **Alonso N., V. Rodríguez, J. Menajovsky, S. Misiunas & J. Carcedo** (2012). Producción de leche caprina con suplementación en época de sequía en el noroeste de Córdoba, Argentina. *Revista Electrónica de Veterinaria.* 13 (8):1-10.
- **Anthony R.V, A.N. Scheaffer, CD. Wright & TR. Regnault** (2003). Ruminant models of prenatal growth restriction. *Reproduction Suppl.* 61:183-194.
- **Arroyo J., & V. Winn.** (2008). Vasculogénesis and angiogénesis in the IUGR placenta. *Seminars in Perinatology* 32:172–177.
- **Augustin H.G., G.Y. Koh, G. Thurston & K. Alitalo** (2009). Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 10:165-177.
- **Barbeito C.G., C.M. Galosi, C.E. Monteavaro, E.L. Portiansky, C. Zanuzzi, M.L. Eöry, N. Fuentealba, M. Woudwyk, P.F.A. Laube, G. Martín Ocampos, M.A. Flamini & E.J. Gimeno** (2010). Patología placentaria: conocimientos generados por estudios experimentales. Facultad de Ciencias Veterinarias. La Plata, Argentina.
- **Bazer F.W., T.E. Spencer, G.A. Johnson, R.C. Burghardt & G. Wu** (2009). Comparative aspects of implantation. *Reproduction* 138:195-209.
- **Bedotti D., A. Gómez, A. García, M. Sánchez, J. Perea & V. Rodríguez.** (2007). Estructura productiva de las explotaciones caprinas del oeste pampeano (Argentina). *Archivos de Zootecnia* 56(213):91-94, Universidad de Córdoba. España.
- **Blair H., C. Jenkinson, S. Peterson, P. Kenyon, D. Van Der Linden, L. Davenport, D. Mackenzie, S. Morris & E. Firth.** (2010). Dam and granddam feeding during pregnancy in sheep affects milk supply in offspring and reproductive performance in grand offspring. *Journal of Animal Science* 88:40–50.
- **Bolin M, E. Wiberg-Itzel, A.K. Wikström, M. Goop, A. Larsson, M. Olovsson & H. Akerud** (2009). Angiopoietin-1/angiopoietin-2 ratio for prediction of preeclampsia. *Am. J. Hypertens.* 22: 891-895.

- **Carmeliet P.** (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* 9:653-660.
- **Chagra Dip E., H. Leguiza, S. Cortéz, G. Aguilar & M. Varas** (2010). Evaluación de los pesos al nacimiento, el crecimiento y consumo de leche de cabritos criollos en un sistema de manejo intensivo. *Revista Argentina de Producción Animal* 2: 131 - 132.
- **Charnock-Jones D.S., P. Kaufmann & T.M. Mayhew** (2004). Aspects of Human Fetoplacental Vasculogenesis and Angiogenesis.I. Molecular Regulation. *Placenta* 25:103–113.
- **Cleaver O. & D. Melton** (2003). Endothelial signaling during development. *Nat. Med.* 9:661-668.
- **Cristofolini A, A. Merkis, F. Barroso, V. Vaquer Balmaceda, F. Allende, A. Chanique & M. Koncurat** (2013). Determinación de apoptosis por TUNEL e inmunoreactividad de las proteínas BCL-2 y BAX durante la placentación porcina. Comunicación. *Revista argentina de producción animal*, 30(1): 43-49.
- **Cueto M., A. Gibbons & M. Abbad** (2000). Reproducción en caprinos. INTA, EEA Bariloche. Centro Regional Patagonia Norte.
- **Davis, S., T.H. Aldrich, P.F. Jones, A. Acheson, D.L. Compton, V. Jain, T.E. Ryan, J. Bruno, C. Radziejewski, P.C. Maisonpierre & G.D. Yancopoulos** (1996). Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 87: 1161-1169.
- **Dayenoff P., J.M. Pizarro Castano, C. Accorinti & M. Morales** (2015). Industria de la carne caprina en Argentina. Segundo Congreso Argentino de Producción Caprina. La Rioja, Argentina. 277-278
- **Di Rienzo J., F. Casanoves, M. Balzarini, L. Gonzales, M. Tablada & C. Robledo** (2009). Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- **Dunk C., M. Shams, S. Nijjar, M. Rhaman, Y. Qiu, B. Bussolati & A. Ahmed** (2000). Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 activate trophoblast Tie-2 to promote growth and migration during placental development. *Am. J. Pathol.* 156: 2185-2199.
- **Espinosa C.** (2011). Angiogénesis en la placenta de los animales domésticos. *Revista. Veterinaria* 22 (2):131-138.
- **Folkman J. & P.A. D'Amore** (1996). Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell.* 87:1153-1155.

- **Fukuhara S., K. Sako, K. Noda, J. Zhang, M. Minami & N. Mochizuki** (2010). Angiopoietin-1/Tie2 receptor signaling in vascular quiescence and angiogenesis. *Histol. Histopathol.* 25:387-396.
- **Gale N.W. & G.D. Yancopoulos** (1999) Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev.*13:1055–1066.
- **Geva E., D.G. Ginzinger, C.J. Zaloudek, D.H. Moore, A. Byrne & R.B. Jaffe** (2002). Human placental vascular development: Vasculogenic and angiogenic (branching and nonbranching) transformation is regulated by vascular endothelial growth factor-A, angiopoietin-1, and angiopoietin-2. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87:4213-4224.
- **Goldman-Wohl D.S, I. Ariel, C. Greenfield, Y. Lavy & S. Yagel** (2000). Tie-2 and angiopoietin-2 expression at the fetal-maternal interface: a receptor ligand model for vascular remodelling. *Mol. Hum. Reprod.* 6(1):81–7.
- **Grazul-Bilska A.T., P.P. Borowicz, M.L. Johnson, M.A. Minten, J.J. Bilski, R. Wroblewski, D.A. Redmer & L.P. Reynolds** (2010) Placental development during early pregnancy in sheep: vascular growth and expression of angiogenic factors in maternal placenta. *Reproduction* 140:165–174.
- **Grazul-Bilska A.T., M.L. Johnson, P.P. Borowicz, M. Minten, R. Wroblewski, L.R. Coupe, D.A. Redmer & L.P. Reynolds** (2011). Placental development during early pregnancy in sheep: cell proliferation, global methylation and angiogenesis in fetal placenta. *Reproduction* 141:529–540.
- **Grazul-Bilska A.T., M.L. Johnson, P.P. Borowicz, L. Baranko, D.A. Redmer & L.P. Reynolds** (2013). Placental development during early pregnancy in sheep: effects of embryo origin on fetal and placental growth, and global methylation. *Theriogenology* 79:94–102.
- **Greenwood P., A. Thompson & S. Ford** (2010). Postnatal Consequences of the maternal environment and of growth during prenatal life for productivity of ruminants. Managing the prenatal environment to enhance livestock productivity. *Journal of Animal Science* 90:1338-1348.
- **Greiss F.C. & S.G. Anderson** (1970). Uterine blood flow during early ovine pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 127:106-30.
- **Hanahan D.** (1997) Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 277:48-50.

- **Hayes A.J., W.Q. Huang, J. Mallah, D. Yang, M.E. Lippman & L.Y. Li** (1999). Angiopoietin-1 and its receptor Tie-2 participate in the regulation of capillary-like tubule formation and survival of endothelial cells. *Microvasc. Res.*58:224-237.
- **Hellstrom M., M. Kalen, P. Lindahl, A. Abramsson & C. Betsholtz** (1999). Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development* 126:3047-3055.
- **Holash J., P.C. Maisonpierre, D. Compton, P. Boland, D.R. Alexander, D. Zagzag, G. D. Yancopoulos & S. J. Wiegand** (1999). Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 284:1994-8.
- **Huang X.L., N. Takakura & T. Suda** (1999). In vitro effects of angiopoietins and VEGF on hematopoietic and endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264:133–8.
- **Igwebuike U.M.** (2009). A review of uterine structural modifications that influence conceptus implantation and development in sheep and goats. *Anim. Reprod. Sci.*112(1-2): 1–7.
- **Igwebuike U.M. & D.N. Ezeasor** (2012). Morphological assessment of placentomal trophoblastic epithelium in the placenta of West African Dwarf goats: A light and electron microscopic study. *Anim. Reprod. Sci.*136: 61– 68.
- **Jain R.** (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 9:685-693.
- **Jones, N., K. Iljin, D.J. Dumont. & K. Alitalo** (2001). Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:257-267.
- **Kappou D, S. Sifakis, A. Konstantinidou, N. Papantoniou & DA. Spandidos** (2015). Role of the angiopoietin/Tie system in pregnancy. *Exp. Ther. Med.* 9(4):1091-1096.
- **Karamysheva A.F** (2008). Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Mosc)* 73:751–762.
- **Kaufmann P., T.M. Mayhew & D.S. Charnock-Jones** (2004). Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. *Placenta* 25:114–26.
- **Kayisli UA., S. Cayli, Y. Seval, F. Tertemiz, B. Huppertz, & R. Demir** (2006). Spatial and temporal distribution of Tie-1 and Tie-2 during very early development of the human placenta. *Placenta* 27(6): 648-659.

- **Khaled M., K.M. Elsayes, A.T. Trout, A.M. Friedkin, P.S. Liu, R.O. Bude, J.F. Platt & C.O. Menias** (2009). Imaging of the placenta: a multimodality pictorial review. *RadioGraphics* 29: 1371-1391.
- **Kingdom J.C.P. & P. Kaufmann** (1997). Oxygen and placental villous development: origins of fetal hypoxia. *Placenta* 18:613–21.
- **Kingdom J., B. Huppertz, G. Seaward & P. Kaufmann** (2000). Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 92:35–43.
- **Klisch K., F.B.P. Wooding, & C.J.P. Jones** (2010), "The glycosylation pattern of secretory granules in binucleate trophoblast cells is highly conserved in ruminants". *Placenta* 31(1):11–17.
- **Korff T., S. Kimmina, G. Martiny-Baron & H.G. Augustin** (2001). Blood vessel maturation in a 3-dimensional spheroidal coculture model: direct contact with smooth muscle cells regulates endothelial cell quiescence and abrogates VEGF responsiveness. *FASEB J.* 447-457.
- **Krikun G., F. Schatz, T. Finlay, S. Kadner, A. Mesia, R Gerrets, & C.J. Lockwood** (2000). Expression of Angiopoietin-2 by Human Endometrial Endothelial Cells: Regulation by Hypoxia and Inflammation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275:159–163.
- **Lamalice L., F. Le Boeuf & J. Huot** (2007). Endothelial Cell Migration During Angiogenesis. *Circ. Res.* 100:782-794.
- **Lanari M.** (2004). Variación y diferenciación genética y fenotípica de la Cabra Criolla Neuquina en relación con su sistema rural campesino. *Tesis Doctoral.* Fac. Biología. Centro Regional Universitario Bariloche. Univ. Nacional del Comahue. 234 p.
- **Larsen L.G., H.V. Clausen & L. Jonsson** (2002). Stereologic examination of placentas from mothers who smoke during pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 186:531–7.
- **Lindahl P., B.R. Johansson, P. Leveen & C. Betsholtz** (1997). Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* 277:242-245.
- **Maisonpierre, P.C., C. Suri, P.F. Jones, S. Bartunkova, S.J. Wiegand, C. Radziejewski, D. Compton, J. McClain, T.H. Aldrich, N. Papadopoulos, T.J. Daly, S. Davis, T.N. Sato & G.D. Yancopoulos** (1997). Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277:55-60.
- **Mayhew TM., C. Bowles & F. Yu"cel** (2002). Hypobaric hypoxia and villous trophoblast: evidence that human pregnancy at high altitude

- (3600 m) perturbs epithelial turnover and coagulation-fibrinolysis in the intervillous space. *Placenta* 23:154–62
- **Papapetropoulos A., G. Garcia-Cardena, T.J. Dengler, P.C. Maisonpierre, G.D. Yancopoulos & W.C. Sessa** (1999). Direct actions of angiopoietin-1 on human endothelium: evidence for network stabilization, cell survival, and interaction with other angiogenic growth factors. *Lab. Invest.* 79:213–223.
 - **Patan S.** (1998). Tie 1 and Tie 2 receptor tyrosine kinases inversely regulate embryonic angiogenesis by the mechanism of intussusceptive microvascular growth. *Microvasc. Res.* 56:1-21.
 - **Peninga L. & L.D. Longo** (1998). Ovine placentome morphology: effect of high altitude, long-term hypoxia. *Placenta* 19 (2-3):187–193.
 - **Redmer D.A., J.M. Wallace & L.P. Reynolds** (2004). Effect of nutrient intake during pregnancy on fetal and placental growth and vascular development. *Domest. Anim. Endocrinol.* 27:199–217.
 - **Redmer D.A., R.P. Aitken, J.S. Milne, L.P. Reynolds & J.M. Wallace** (2005). Influence of maternal nutrition on messenger RNA expression of placental angiogenic factors and their receptors at mid gestation in adolescent sheep. *Biol Reprod* 72: 1004-1009.
 - **Regnault T., B. Vrijer, H. Galan, M. Davidsen, K. Trembler, F. Battaglia, R. Wilkening & R. Anthony** (2003). The relationship between transplacental O₂ diffusion and placental expression of PlGF, VEGF and their receptors in a placental insufficiency model of fetal growth restriction. *J. Physiol* 550.2:641–656.
 - **Rennie M.Y., J. Detmar, K.J. Whiteley, J. Yang, A. Jurisicova, S.L. Adamson & J.G. Sled** (2011). Vessel tortuosity and reduced vascularization in the fetoplacental arterial tree after maternal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 300:675–684.
 - **Reynolds L.P** (1986). Utero-ovarian interactions during early pregnancy: role of conceptus induced vasodilation. *J. Anim. Sci* 62:47–61.
 - **Reynolds L.P. & D.A. Redmer** (1995). Utero-placental vascular development and placental function. *J. Anim. Sci* 73:1839–1851.
 - **Reynolds L. & D. Redmer** (2001). Angiogenesis in the Placenta. *Biol. Reprod.* 64:1033–1040.
 - **Reynolds L., P. Borowicz, K. Vonnahme, M. Johnson, A. Grazul-Bilska, J. Wallace, J. Caton & D. Redmer** (2005). Animal Models of Placental Angiogenesis. *Placenta* 26: 689-708.

- Reynolds L.P., J.S. Caton, D.A. Redmer, A.T. Grazul-Bilska, K.A. Vonnahme, P.P. Borowicz, J.S. Luther, J.M. Wallace, G. Wu & T.E. Spencer (2006). Topical Review: Evidence for altered placental blood flow and vascularity in compromised pregnancies. *J Physio.* 572:51-58.
- Reynolds L.P., P.P. Borowicz, J.S. Caton, K.A. Vonnahme, J.S. Luther, D.S. Buchanan, S.A. Hafez, A.T. Grazul-Bilska & D.A. Redmer (2010). Uteroplacental vascular development and placental function: an update. *Int. J. Dev. Biol.* 54:355–366.
- Reynolds L.P., K.A. Vonnahme, C.O. Lemley, D.A. Redmer, A.T. Grazul-Bilska, P.P. Borowicz & J.S. Caton (2013). Maternal stress and placental vascular function and remodeling. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 564–593.
- Ribatti D. (2008). Transgenic mouse models of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* 266:1-35.
- Roa I., SC. Smok & GR. Prieto (2012). Placenta; anatomía e histología comparada. *Int. J. Morphol.* 30(4):1490-1496.
- Rojas M. & A. Rodríguez (1987). *Placenta. En: Embriología para Medicina Veterinaria.* Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
- Santos R., J. Barreto Filho, A. Marques & J. Andrade (1998). Volumetric proportions of the goat placenta structural components throughout gestation. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 35 (4): 156-160.
- Sato, T.N., Y. Qin, C.A. Kozak & K.L. Audus, (1993). Tie-1 and tie-2 define another class of putative receptor tyrosine kinase genes expressed in early embryonic vascular system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90:9355–9358
- Scharpfenecker M., U. Fiedler, Y. Reiss & H.G. Augustin (2005) The Tie-2 ligand angiopoietin-2 destabilizes quiescent endothelium through an internal autocrine loop mechanism. *J. Cell. Sci.* 118:771-780.
- Schneuer F.J., C.L. Roberts, A.W. Ashton, C. Guilbert, V. Tasevski, J.M. Morris & N. Nassar (2014). Angiopoietin 1 and 2 serum concentrations in first trimester of pregnancy as biomarkers of adverse pregnancy outcomes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 210:345.e1-e9.
- Servicio Nacional de Sanidad y calidad Agroalimentaria (SENASA) (2013). Indicadores Ganaderos. Información del Sistema Integrado de Gestión para la Sanidad Animal al 31/03/2013.
- Seval Y., L. Sati, C. Celik-Ozenci, O. Taskin & R. Demir (2008). The distribution of angiopoietin-1, angiopoietin-2 and their receptors tie-1 and tie-2 in the very early human placenta. *Placenta* 29: 809-815.

- **Shibuya M. & L. Claesson-Welsh** (2006). Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp. Cell Res.* 312:549-560.
- **Shimizu T., Y. Hoshino, H. Miyazaki & E. Sato** (2012). Angiogenesis and microvasculature in the female reproductive organs: physiological and pathological implications. *Curr. Pharm Des* 18:303-309.
- **Singh H., T.A. Tahir, D.O.A. Alawo, E. Issa & N.P.J. Brindle** (2011). Molecular control of angiopoietin signaling. *Biochem. Soc. Trans* 39(6):1592-6.
- **Soares M.J., B.M. Chapman, C.A. Rasmussen, G. Dai & T. Kamei** (1996). Differentiation of trophoblast endocrine cells. *Placenta* 17: 277-289.
- **Stratmann A., W. Risau, & K.H. Plate** (1998). Cell type-specific expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 suggests a role in glioblastoma angiogenesis. *Am. J. Pathol.* 153:1459-1466.
- **Sugimachi K., S. Tanaka, K. Taguchi, S. Aishima, M. Shimada, & M. Tsuneyoshi** (2003). Angiopoietin switching regulates angiogenesis and progression of human hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Pathol.* 56: 854-860.
- **Suri C., P.F. Jones, S. Patan, S. Bartunkova, P.C. Maisonpierre, S. Davies, T.N. Sato & G.D. Yancopoulos** (1996). Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the Tie-2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 87:1171–1180.
- **Thurston G., C. Suri, K. Smith, J. McClain, T.N. Sato, G.D. Yancopoulos & D.M. McDonald** (1999). Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* 286:2511-4.
- **Valenzuela D.M., J.A. Griffiths, J. Rojas, T.H. Aldrich, P.F. Jones, H. Zhou, J. McClain., N.G. Copeland, D.J. Gilbert, N.A. Jenkins, T. Huang, N. Papadopoulos, P.C. Maisonpierre, S. Davis, & G.D. Yancopoulos** (1999) Angiopoietins 3 and 4: Diverging gene counterparts in mice and humans. *PNAS* 96, 1904–1909.
- **Vonnahme K.A., M.E. Wilson & S.P. Ford** (2001). Relationship between placental vascular endothelial growth factor expression and placental/endometrial vascularity in the pig. *Biol. Reprod.* 64:1821-1825.
- **Vonnahme K.A, M.E. Wilson, & S.P. Ford** (2002). Conceptus competition for uterine space: Different strategies exhibited by the Meishan and Yorkshire pig. *J. Anim. Sci.* 80:1311-1316.

- **Wallace J.M, T.R. Regnault, S.W. Limesand, W.W. Jr. Hay & R.V. Anthony** (2005). Investigating the causes of low birth weight in contrasting ovine paradigms. *J Physiol* 565(Pt 1): 19-26.
- **Wallez Y., I. Vilgrain & P. Huber** (2006). Angiogenesis: the VE-cadherin switch. *Trends Cardiovasc. Med.* 16: 55-59.
- **Witzenbichler B, P.C. Maisonpierre, P. Jones, G.D. Yancopoulos & J.M. Isner** (1998) Chemotactic properties of angiopoietin-1 and -2 ligands for the endothelial-specific receptor tyrosine kinase Tie2. *J. Biol. Chem.* 273:18514–18521
- **Wong A.L, Z.A. Haroon, S. Werner, M.W. Dewhirst, C.S. Greenberg & K.G. Peters** (1997). Tie2 expression and phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. *Circ. Res.* 81:567-574.
- **Wooding F.B.P., G. Morgan, S. Monaghan, M. Hamon, & R.B. Heap** (1996). “Functional specialization in the ruminant placenta: evidence for two populations of fetal binucleate cells of different selective synthetic capacity”. *Placenta* 17(1):75–86.
- **Wooding P. & G. Burton** (2008). Comparative placentation: structure, functions and evolution. *Springer. Verlag Berlin Heidelberg.*: 1-291.
- **Zhang E.G., S.K. Smith, P.N. Baker & D.S. Charnock-Jones** (2001). The regulation and localization of angiopoietin-1, -2, and their receptor Tie2 in normal and pathologic human placentae. *Mol. Med.* 7: 624-635.
- **Zimmerman M.** (2013). Carne Caprina Argentina. *Primer Congreso Argentino de Producción Caprina.* 116-125.
- **Zygmunt M., F. Herr, K. Munstedt, U. Lang & O.D. Liang** (2003). Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 110:10 –18.

