



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN  
CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD  
ANIMAL**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
REPRODUCCIÓN**

**DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES SÉRICOS DE  
P4, VEGF Y PIGF-1 EN UN MODELO DE GESTACIÓN  
INTERESPECIES (*Ovis aries* x *Ovis canadensis*)**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN  
CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**CLAUDIA ABRIL GÓMEZ ALATRISTE**

**TUTOR PRINCIPAL: OCTAVIO MEJÍA VILLANUEVA FMVZ-UNAM**

**COMITÉ TUTORAL: ANA MARÍA ROSALES TORRES UAM-X**

**LUIS ALBERTO ZARCO QUINTERO FMVZ-UNAM**

**MÉXICO D.F. FEBRERO 2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **DEDICATORIA**

A mis padres quienes nunca dejaron de creer en mí y siempre me brindaron apoyo, consejos, sabiduría y fortaleza.

A mi hermano, por su solidaridad incondicional y por reconfortarme con su compañía y alegría en todo momento.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Doctor Octavio Mejía por darme la oportunidad y la confianza de realizar este proyecto, compartir sus conocimientos y por demostrarme que soy capaz de cumplir lo que me proponga

A la Doctora Ana María Rosales por ser mi ejemplo a seguir, por todas sus atenciones, por abrirme las puertas del Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción de la UAM-X y enseñarme que solo a base de trabajo, esfuerzo, disciplina y constancia se llega al éxito.

Al Doctor Luis Zarco, por ser un excelente profesor, por su paciencia y por transmitirme ese interés hacia el conocimiento, hacia el estudio.

A la Doctora Clara Murcia Mejía por su apoyo y asesoría en el procesamiento de las muestras utilizadas en esta tesis en el Laboratorio de Endocrinología del Departamento de Reproducción Animal en la FMVZ-UNAM.

A la MC. Ana Delia Rodríguez por su dedicación, trabajo, esfuerzo perseverancia incondicional para el presente proyecto, particularmente en la medición de las muestras utilizadas en esta tesis, las cuales fueron procesadas en el Laboratorio de Endocrinología del Departamento de Reproducción Animal de la FMVZ UNAM.

Al MC Daniel Díaz por su colaboración en el análisis e interpretación de los resultados, por su atención y dedicación hacia el proyecto y por transmitir sus conocimientos.

A todo el personal del CEIEPO, por permitirme utilizar sus instalaciones, por darme la confianza de trabajar con sus animales, facilitar mi estancia y brindarme apoyo mientras realizaba mi trabajo de campo.

Al CONACYT, por la beca otorgada durante mis estudios de maestría.

**Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el financiamiento otorgado al proyecto IT201512.**

## RESUMEN

En el presente estudio se compararon las concentraciones séricas de progesterona, factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y factor de crecimiento placentario (PIGF-1) durante gestaciones de ovejas domésticas suffolk vs las gestaciones interespecíficas logradas a partir de la inseminación de ovejas domésticas (*Ovis aries*) con semen de carnero cimarrón (*Ovis canadensis mexicana*). Adicionalmente, al parto, se recuperaron las placentas, para contabilizar y medir los cotiledones y se registró el peso y dimensiones corporales de las crías al nacimiento. Durante toda la gestación de ovejas domésticas se presentaron concentraciones de progesterona y PIGF-1 mayores que durante la gestación híbrida. En el caso del VEGF se obtuvieron mayores concentraciones durante el segundo y tercer tercios de las gestaciones híbridas, en comparación con las domésticas. Las placentas de las gestaciones interespecíficas presentaron una menor área cotiledonaria total ( $221.5\text{mm}^2$ ) en comparación con las domésticas ( $669.7\text{mm}^2$ ). Al nacimiento, las crías híbridas pesaron menos ( $2.1\pm 0.1$  kg) que las domésticas ( $4.6\pm 0.2$  kg), a pesar de que la duración de la gestación fue mayor en las híbridas ( $153\pm 0.96$  días) que en las domésticas ( $147\pm 0.89$  días). Los resultados de este trabajo establecen una base para el entendimiento de diferentes sucesos como son la restricción del crecimiento placentario y fetal en este tipo de cruce.

**Palabras clave:** *Ovis canadensis*, *Ovis aries*, gestación interespecífica, placenta, progesterona, VEGF, PIGF-1.

## **ABSTRACT**

The aim of this study was to compare serum concentrations of progesterone, vascular endothelium growth factor (VEGF) and placental growth factor (PIGF-1) between normal pregnancies of domestic ewes and interespecific pregnancies produced through the insemination of domestic ewes (*Ovis aries*) with semen of Cimarron rams (*Ovis canadensis mexicana*). Additionally at the time of delivery the placentas were recovered and the cotyledons were counted and measured, and the body weight and size of the lamb were recorded. Throughout gestation the concentrations of progesterone and PIGF-1 were higher in domestic pregnancies than in hybrid pregnancies. In contrast, VEGF concentrations were higher in hybrid than in domestic pregnancies during the second and third thirds of pregnancy. The placentas of hybrid gestation had lower total cotyledonary area (221.5mm<sup>2</sup>) compared with the domestic pregnancies (669.7mm<sup>2</sup>). At birth, the hybrid lambs weighed less (2.1 ± 0.1kg) than the domestic lambs (4.6 ± 0.2kg) even though the duration of pregnancy was longer in hybrid pregnancies (153 ± 0.89 days) than in domestic gestations (147 ± 0.89 days). The results of this study provide a basis for understanding some of the challenges faced during this type of hybrid gestation, such as placental and fetal growth restriction.

**Key words:** *Ovis canadensis*, *Ovis aries*, interspecific pregnancy, placenta, progesterone, VEGF, PIGF-1.

# INDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>4</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>I.INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
<b>II.REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
CARACTERÍSTICAS REPRODUCTIVAS DE LOS BORREGOS DOMÉSTICO Y CIMARRÓN.....	15
Ciclo estral .....	15
PREIMPLANTACIÓN E IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA.....	16
SECRECIÓN DE PROGESTERONA.....	20
<b>PLACENTACIÓN</b> .....	<b>23</b>
<b>Desarrollo de las membranas fetales</b> .....	<b>24</b>
<b>Saco vitelino</b> .....	<b>24</b>
<b>Corion, amnios y alantoides</b> .....	<b>24</b>
<b>CLASIFICACIÓN DE LAS PLACENTAS</b> .....	<b>25</b>
<b>CIRCULACIÓN UTERINA Y PLACENTARIA</b> .....	<b>27</b>
<b>ANGIOGÉNESIS PLACENTARIA</b> .....	<b>28</b>
<b>FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR (VEGF)</b> ..	<b>30</b>
<b>FACTOR DE CRECIMIENTO PLACENTARIO (PIGF)</b> .....	<b>35</b>
<b>GESTACIONES INTERESPECIES</b> .....	<b>39</b>
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>43</b>
<b>IV. HIPOTESIS</b> .....	<b>43</b>
<b>V. OBJETIVOS</b> .....	<b>44</b>
Objetivo general.....	44
Objetivos específicos.....	44
<b>VI. MATERIAL Y METODOS</b> .....	<b>45</b>
Localización y animales.....	45

Sincronización e inseminación artificial.....	45
<b>Diagnóstico de Gestación</b> .....	<b>47</b>
<b>Muestras sanguíneas</b> .....	<b>47</b>
Procesamiento de las muestras.....	48
<i>Radioinmunoensayo</i> .....	48
<i>Enzimo-inmunoanálisis (ELISA)</i> .....	48
<b>Morfometría de las placentas</b> .....	<b>49</b>
<b>Morfometría de las crías</b> .....	<b>50</b>
<b>Análisis estadístico</b> .....	<b>50</b>
<b>VII. RESULTADOS</b> .....	<b>51</b>
Efecto del grupo 1 y 2 (híbrido ó doméstico), sobre las concentraciones séricas de progesterona a lo largo de la gestación.....	51
Efecto del grupo 1 y 2 (híbrido ó doméstico), sobre las concentraciones séricas de VEGF a lo largo de la gestación .....	52
Efecto del grupo 1 y 2 (híbrido ó doméstico), sobre las concentraciones séricas de PIGF a lo largo de la gestación .....	52
Efecto del grupo 1 y 2 (doméstico e híbrido) sobre el tiempo de gestación, las características de la placenta y la morfometría de las crías .....	57
<b>VIII. DISCUSIÓN</b> .....	<b>60</b>
<b>IX. CONCLUSIÓN</b> .....	<b>70</b>
<b>X. LITERATURA</b> .....	<b>71</b>

## **CUADROS Y FIGURAS**

<b>Figura a.- División de la placenta en cuatro cuadrantes.....</b>	<b>49</b>
<b>Figura b.-Medidas cotiledón.....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 1.- Concentración de Progesterona durante la gestación.....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 2.- Concentración del VEGF durante la gestación.....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 3.- Concentraciones del PIGF durante la gestación.....</b>	<b>55</b>
<b>Figura 4.- Gráfica de progesterona, VEGF y PIGF durante la gestación (antes-después).....</b>	<b>57</b>
<b>Cuadro 1.- Características morfométricas de la placenta de ovejas del grupo 1 y grupo 2.....</b>	<b>58</b>
<b>Cuadro 2.- Características morfométricas de las crías de ovejas nacidas del grupo 1 y grupo 2 .....</b>	<b>59</b>

## I. INTRODUCCIÓN

Las gestaciones interespecies pueden ser modelos para estudiar la fisiología reproductiva de animales domésticos y silvestres. Algunos eventos indispensables para el establecimiento y desarrollo de la gestación, aún no han sido descritos en la mayoría de las especies silvestres, debido a las dificultades y riesgos asociados con este tipo de seguimiento, sin embargo, dichos eventos fisiológicos pueden ser inferidos en detalle en gestaciones obtenidas entre una especie doméstica y una silvestre. El conocimiento así generado puede usarse para desarrollar técnicas de reproducción asistida en especies amenazadas o en peligro de extinción, principalmente en poblaciones *ex situ* (Bennett y Foster, 1985; Bunch y Workman, 1988; Coonrod et al, 1994; Lasley et al, 1994; Cognie, 1999).

El borrego Cimarrón en México tiene un gran valor cultural y económico, lo que justifica el establecimiento y desarrollo de estrategias biotecnológicas, como la recolección y congelación de semen, la inseminación artificial y la transferencia de embriones, entre otras (Madan et al, 1994).

Se han logrado hibridaciones y gestaciones interespecies exitosas dentro del género *Ovis*, tomando ventaja de que la oveja doméstica posee características reproductivas similares a aquellas presentadas en las ovejas cimarrón (Delgadillo et al, 2003) y muflón (Garde et al, 1995); en cuanto al número cromosómico ( $2n=54$ ), ciclo estral y duración de la gestación, realizándose así hibridaciones por monta dirigida o inseminación artificial (Garde et

al, 1995). También se han obtenido crías viables mediante la transferencia de embriones de Muflón a ovejas domésticas (Hoffman, 1973; Bunch y Workman, 1988; Garde et al, 1995, Santiago-Moreno et al, 2006). De la misma manera, se han obtenido híbridos entre Muflón y borregos Argali (*O. argali*) (Bunch y Cox, 1980), y se ha logrado la producción de crías de borrego Rojo Armenio (*O. orientalis*), mediante la fertilización *in vitro* y la transferencia de los embriones producidos a ovejas domésticas (Coonrod et al, 1994).

En pequeños rumiantes, la producción de hembras híbridas se contempla como una opción viable para la multiplicación de especies amenazadas o en peligro de extinción como la cabra silvestre española (*Capra pyrenaica hispanica*) (Fernández et al, 1999, 2001) o del borrego Cimarrón (*Ovis canadensis mexicana*) (Mejía et al, 2001, 2008). El borrego Cimarrón en México se ubica como una especie amenazada, dentro del apéndice II por el CITES, y por la NOM-ECOL- 059/94 como una especie sujeta a protección especial. Debido a esta situación se han derivado diversas investigaciones para su conservación. Así, Mejía et al (2008), demostraron que al transferir embriones de Cimarrón a ovejas receptoras domésticas estos embriones no se implantan, lo que podría deberse a una falla en el reconocimiento y establecimiento de la gestación. No obstante, también se demostró que puede llevarse a cabo la implantación de un embrión de Cimarrón en ovejas híbridas F1 (*Ovis canadensis* x *Ovis aries*). Sin embargo, en este caso la gestación no es completada, ya que se pierde alrededor del día 156, aproximadamente 20 días antes de la ocurrencia del parto de una hembra Cimarrón en condiciones naturales. La gran diferencia entre la duración normal de la

gestación de la oveja doméstica y la de la oveja Cimarrón (más de 20 días de diferencia) aparentemente resulta en una marcada asincronía en el ritmo de desarrollo placentario y fetal con respecto a la fisiología materna. Así, en las gestaciones de embrión *Ovis canadensis* en ovejas híbridas se ha encontrado un desarrollo placentario inadecuado que es incapaz de soportar un rápido crecimiento de las estructuras placentarias y del producto durante el último tercio de gestación, etapa en la que el crecimiento es exponencial. De cualquier manera, se demostró que las borregas híbridas pueden ser piezas clave, ya que son capaces de reconocer la gestación de embriones cimarrones y de desarrollar una gestación de mayor duración que las ovejas domésticas (Mejía et al, 2008).

Desafortunadamente, la producción de hembras F1 no es sencilla, ya que las gestaciones interespecie de borregos Cimarrón con domésticos (*Ovis canadensis* x *O. aries*) poseen características particulares. Por ejemplo, la duración de la gestación es mayor ( $152 \pm 1.41$  días), que la de una gestación normal de oveja doméstica. Además, en las gestaciones híbridas hay menores concentraciones de progesterona sérica materna a lo largo de la gestación, un inadecuado desarrollo placentario, una vascularización disminuída, un menor número y tamaño de cotiledones, lo cual resulta en el nacimiento de crías de bajo peso y tamaño (Calderón, 2009). También se ha encontrado que en estas gestaciones existe un menor número de células binucleadas (Calderón, 2009), las cuales son importantes ya que están encargadas de la síntesis y secreción de diversas proteínas y hormonas, como el lactógeno placentario, las glicoproteínas asociadas a la gestación y la progesterona (Spencer et al, 2007).

La unidad feto-placentaria tiene un papel muy importante para la síntesis de hormonas, la regulación del crecimiento fetal y el mantenimiento de la gestación. La placenta, colabora con la madre y el feto para la síntesis de hormonas esteroides y peptídicas que se secretan hacia la circulación materna y fetal (Neill, 2005). En la oveja, el establecimiento y mantenimiento de la gestación requiere de la integración e intercambio de señales endócrinas y parácrinas entre el ovario, el útero, la placenta y el feto (Spencer et al, 2007).

Para el desarrollo adecuado de la placenta es necesaria una comunicación recíproca y fundamental entre el producto y el endometrio desde el momento en que ocurre el reconocimiento de la gestación (días 14-16 de la gestación) y comienza la implantación (Spencer et al, 2004), período en el cual los placentomas incrementarán hasta cuatro veces su peso y el flujo sanguíneo aumentará también cuatro veces su volumen (Reynolds et al, 2005). El mantenimiento de la gestación durante este periodo depende en gran parte del intenso crecimiento y la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) en la placenta, lo cual se asocia directamente con el volumen del flujo sanguíneo uterino y umbilical y se refleja finalmente en el peso fetal y tamaño de la placenta (Reynolds et al, 2005).

En los ratones se ha demostrado que la progesterona desempeña un papel muy importante en la maduración de los vasos sanguíneos del endometrio, acción que se va incrementando conforme se va desarrollando la angiogénesis (Girling et al, 2007).

La función fundamental de la progesterona es colaborar en el mantenimiento de la gestación, para lo cual ejerce efectos directos

sobre la diferenciación celular del estroma uterino, la implantación del producto, el crecimiento placentario y la secreción de otras hormonas. Otros efectos de la progesterona también influyen sobre el peso al nacer de la cría, ya que un estudio indica que al haber altos niveles de progesterona se promueve la movilización de ácidos grasos y glucosa de las reservas corporales de la madre, para ser transportados por la circulación materna y llegar a la placenta, en donde son utilizados por el feto para su crecimiento (Manalu-Sumayardi, 1998).

En ovinos, se ha demostrado que en respuesta a situaciones de hipoxia, se expresa el gen del factor inducible por hipoxia tipo 1 (HIF-1A), el cual ocasiona la activación de la eritropoyesis, la glicólisis y la angiogénesis para contrarrestar la deficiencia de oxígeno. La capacidad de responder a la hipoxia, es aumentando la expresión del gen HIF-1A, el cual es inducido por la progesterona y estimulado por el interferón tau, lo que a su vez favorece la expresión del factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) en el endometrio y el trofoectodermo del embrión (Bazer et al, 2008). La expresión de VEGF y del factor de crecimiento placentario (PIGF) en tejidos placentarios (carúnculas y cotiledones) de la oveja doméstica, aumenta conforme la gestación avanza y ambos factores están relacionados con el crecimiento vascular de la placenta (Regnault et al, 2002).

En estudios realizados en humanos, el VEGF como el PIGF tienen una relación con el establecimiento de los lechos capilares del mesenquima, de las vellosidades placentarias y con la finalización de la vasculatura capilar placentaria (Ahmed et al, 2000). Se conoce que una pobre invasión capilar limita la cantidad

de flujo sanguíneo hacia el espacio entre las vellosidades y otras arterias secundarias, resultando en insuficiencia placentaria por baja perfusión (Ferrazi et al, 2011), por lo que se disminuye el transporte de nutrientes y oxígeno de la madre al feto (Morrison, 2008), originando una restricción del crecimiento fetal acompañada por hipertensión e individuos de bajo peso al nacimiento (McCarthy et al, 2011).

Debido a que en las gestaciones híbridas entre oveja doméstica y borrego cimarrón existen fallas en la función de la placenta, se evaluará si estas fallas están asociadas a cambios en P4, VEGF y PIFG. Para lograr este objetivo se compararán las concentraciones de estas hormonas a lo largo de gestaciones híbridas (*Ovis aries* X *Ovis canadensis*) y gestaciones domésticas asociándolas con parámetros de desarrollo placentario y fetal.

## **II.- REVISIÓN DE LITERATURA**

### **CARACTERÍSTICAS REPRODUCTIVAS DEL BORREGO DOMÉSTICO Y CIMARRÓN.**

#### **Ciclo estral**

Tanto los borregos domésticos como los borregos Cimarrón, son especies poliéstricas estacionales en los que la estacionalidad reproductiva es regulada principalmente por los cambios en el fotoperiodo. En ambas especies la época reproductiva se inicia cuando la duración de las horas luz del día disminuye. De manera general, en México la época reproductiva para ambas especies (en cautiverio), abarca aproximadamente de agosto a enero, seguido por un anestro caracterizado por ausencia de ciclos estrales durante la época en la que las horas luz van en aumento, siendo por lo general durante los meses de febrero a julio (Hafez, 2002; Rosa y Bryant, 2003; Porras et al, 2003; Álvarez y Medellín, 2005). La estacionalidad reproductiva permite que las crías nazcan en la mejor época del año y tengan por lo tanto una mayor probabilidad de supervivencia (Porras et al, 2003).

Sin embargo existen diferencias entre el ciclo estral de las ovejas cimarronas y las ovejas domésticas. En las ovejas domésticas el ciclo estral dura de 16 a 17 días, y el estro que tiene una duración de 30 a 36 horas, ocurriendo la ovulación entre las 24 y 30 horas después de haber iniciado éste. El metaestro abarca desde que termina el estro hasta que se completa la formación del cuerpo lúteo (día 3 o 4 del ciclo), lo que es seguido por 9 a 10 días

de plena funcionalidad lútea (diestro), durante el cual hay niveles elevados de progesterona. Una vez que el cuerpo lúteo regresa, transcurren 2 a 3 días de proestro antes de iniciarse el siguiente estro (Hafez, 2002; Pineda y Dooley, 2002). En el caso de las borregas Cimarrón se sabe que la duración del ciclo estral completo es en promedio de 28 días, sin que exista información precisa respecto a la duración de cada una de las fases (Monson y Sumner, 1980; Soto, 2006).

La duración de la gestación también es distinta entre las ovejas domésticas (146 a 150 días) y las hembras Cimarrón (175 a 179 días). Por lo regular estas últimas tienen una cría por parto, aunque se ha reportado la ocurrencia de partos gemelares (Monson y Sumner, 1980; Álvarez y Medellín, 2005).

## **PREIMPLANTACIÓN E IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA**

Se considera como el periodo de preimplantación embrionaria al que transcurre desde la fertilización del ovocito por el espermatozoide, hasta que el blastocito se expande para llenar toda la luz uterina, lo que permite su inmovilización y el inicio de una interacción entre el corión del embrión y el endometrio (Spencer et al, 2007).

Una vez ocurrida la fertilización, el cigoto sufrirá una serie de modificaciones epigenéticas que regularán la expresión de diferentes factores de transcripción (Duranthon et al, 2008). Inicialmente el genoma del embrión se encuentra en estado inactivo

y el desarrollo embrionario es controlado por RNA mensajero materno de larga duración, insertado en el ovocito durante la fase final de su desarrollo.

La activación del genoma embrionario es la transición desde el control materno del desarrollo, hacia el control por parte del embrión. Su regulación es importante porque deben comenzar a expresarse apropiadamente los genes embrionarios relacionados con la división, desarrollo y compactación del embrión (Martínez, 2006). Una vez iniciada la transcripción del genoma embrionario se marca la pauta para que el embrión asuma el control de su propio desarrollo. El tiempo de inicio de la activación del genoma embrionario difiere entre las especies. En ratones, la activación del genoma ocurre en el estado de dos células, mientras que en el bovino inicia en el estado de ocho células. Aunque se desconocen todos los mecanismos relacionados con la regulación de la activación del genoma embrionario, se cree que los cambios y procesos que sufre la cromatina embrionaria desde la fertilización, son básicos para asegurar un estricto control de la activación del genoma, incluyendo tanto los cambios transcripcionales como el inicio de la replicación del ADN (Boskovic et al, 2012).

Durante el periodo de pre-implantación, el cigoto formado luego de la fertilización, se divide en 2 blastómeros idénticos, comenzando la etapa de segmentación. Estos blastómeros se siguen dividiendo hasta llegar al estado de mórula. En los ovinos, el embrión llega al útero en este estado, aproximadamente al día 5 de la gestación. Entre el día 5 y el día 6 se forma el blastocito, el cual está compuesto por una cavidad llena de líquido denominado blastocele, está delimitado por una capa celular denominada

trofotodermo (Black et al, 2010), el cual rodea a un pequeño grupo celular llamado en conjunto “masa celular interna”, a partir del cual se desarrollará el embrión (Duranthon et al, 2008).

En el día 8 de gestación, el blastocito sale de la zona pelúcida. En este proceso, denominado “eclosión”, la zona pelúcida es rasgada y el blastocito sale a través de dicha abertura, con lo que el trofotodermo queda en contacto directo con el líquido uterino. Durante los días siguientes el blastocito continúa creciendo y desarrollándose (Spencer et al, 2007). A partir del día 11 de la gestación ocurre la “elongación” del embrión, proceso a través del cual el blastocito pasa de una forma esférica a una tubular. El trofoblasto del blastocito tubular se alarga en forma de filamento, alcanzando una longitud de casi 25cm para el día 17 de la gestación. El crecimiento del trofoblasto provoca que el blastocito abarque el espacio intrauterino y se inmovilice (Spencer et al, 2007). A pesar de ello, inicialmente el embrión se mantiene libre en el ambiente intrauterino, ya que las proteínas MUC1 presentes en el epitelio luminal funcionan como estructuras bloqueadoras de la adhesión, evitando el contacto y fijación del trofotodermo con el endometrio. Mientras tanto el embrión se nutre del histotrofo, el cual es secretado por el epitelio luminal y glandular del endometrio bajo la influencia de la progesterona (Spencer et al, 2007).

La “aposisión” es el posicionamiento del embrión sobre el epitelio luminal endometrial, lo que es seguido por la formación de una papila trofoblástica que se extenderá sobre el epitelio glandular. Entre los días 15 y 16 de gestación, disminuye la expresión de las proteínas MUC1, dejando expuestas a las integrinas, que permitirán que el embrión se adhiera al endometrio, ocasionando la aparición

de proyecciones citoplasmáticas del trofotodermo hacia el epitelio luminal endometrial (Spencer et al , 2007). Esto asegura que para el día 17 de la gestación se produzca una firme adhesión del producto con las áreas carunculares e intercarunculares. Finalmente comienza la fase de invasión endometrial por células del trofotodermo y la formación de la placa sincitial, -( El trofotodermo está compuesto por dos tipos celulares morfológica y funcionalmente distintos: las células mononucleadas y las células binucleadas del trofoblasto)-. (Igwebuike, 2006; Spencer et al, 2007).

Las células mononucleadas se encuentran en mayor cantidad y están principalmente relacionadas con el intercambio de nutrientes (Igwebuike, 2006). En la oveja, hacia el día 14 de la gestación, algunas células mononucleadas trofoblásticas presentan divisiones nucleares sin división celular, por lo que a éstas se les denominará células binucleadas gigantes del trofoblasto (BNC) y para el día 16 de gestación, estas células representarán hasta un 14 a 20% del total de la capa trofoectodérmica. Entre los días 16 a 24 de la gestación aparecen las placas sincitiales, las cuales son el resultado de la migración y fusión de las células binucleadas con células de las microvellosidades del epitelio luminal, resultando en la formación de células feto-maternas híbridas y trinucleadas, las cuales son la base de las placas sincitiales multinucleadas que cubrirán completamente a las carúnculas para el día 24 de gestación. Este sincitio caruncular se irá expandiendo durante la formación de los cotiledones, mediante repetidas migraciones y fusiones de las BNC (Spencer et al, 2007).

Las BNC tienen al menos dos funciones principales; la primera es la formación del sincitio feto-materno, para una exitosa implantación y consecuentemente, el crecimiento cotiledonario y la formación de los placentomas; mientras que la segunda función es la síntesis y secreción de proteínas como el lactógeno placentario y las glicoproteínas asociadas a la gestación, así como la síntesis de progesterona (Igwebuike, 2006; Spencer et al, 2007).

## **SECRECIÓN DE PROGESTERONA**

La progesterona es una hormona esteroide producida por el cuerpo lúteo, tanto en la fase lútea del ciclo estral como durante la gestación (Spencer y Bazer, 2002). En el cuerpo lúteo la síntesis de progesterona es estimulada por acción de la hormona luteinizante (LH). La LH facilita el transporte del colesterol desde el citoplasma hacia la matriz mitocondrial, lo que permite su conversión en pregnenolona, la cual posteriormente es convertida en progesterona (Ayad et al, 2007). La progesterona es metabolizada de manera extensiva en el feto ovino, especialmente en el hígado y en las células rojas fetales. Se han encontrado concentraciones en el líquido amniótico y alantoideo, siendo ésta concentración mayor en el líquido amniótico (Power et al, 1982).

En las ovejas, las funciones endometriales alrededor del momento de la implantación son reguladas principalmente por la progesterona proveniente del cuerpo lúteo, así como por otros factores producidos por el embrión, como es el interferón tau (IFNt) el cual es necesario para el reconocimiento materno de la

gestación. El IFNt se produce entre el día 10 y 25 por las células del trofoectodermo (Song et al, 2008). Durante el ciclo estral de la oveja, los receptores endometriales para oxitocina se unen a la oxitocina del epitelio luminal y glandular, lo que induce a la liberación de pulsos de prostaglandina F2 alfa (PGF2 $\alpha$ ), que causan la regresión del cuerpo lúteo. Para que en el útero existan suficientes receptores para oxitocina se requiere que el estradiol actúe en sus propios receptores, con lo que se induce la síntesis y recilaje de receptores para oxitocina. En la oveja gestante el IFNt se liga a su receptor Tipo 1 (IFNAR) en el epitelio luminal y glandular, ocasionando la inhibición de los receptores para estrógenos. Por lo tanto, los estrógenos no pueden inducir la expresión de los receptores para oxitocina requeridos para la liberación de la PGF2 $\alpha$  en forma de pulsos, por lo que no ocurre la luteólisis funcional y el cuerpo lúteo continuará secretando progesterona a lo largo de la gestación (Spencer et al, 2007).

En el caso de los ovinos, después del día 50 de gestación, la placenta se encarga de producir progesterona, suplementando a la producida por el cuerpo lúteo. Experimentalmente la progesterona placentaria es suficiente como para sostener la gestación en ausencia del cuerpo lúteo (Hansen ,1998). Ya que diferentes estudios han demostrado que cuando se realiza una ovariectomía en la oveja al día 20 de gestación, ésta puede mantenerse mediante inyecciones de progesterona, hasta que la placenta asuma la producción de esta hormona (Bindon, 1970).

La progesterona participa en la diferenciación y morfogénesis de las glándulas endometriales durante la gestación, ya que el aumento de progesterona induce la expresión de proteínas en el

epitelio glandular endometrial, las cuales son secretadas hacia la luz uterina. Dentro de estas proteínas se encuentran las proteínas de la leche uterina (UTMP), las cuales sirven como excelentes marcadores de la capacidad secretora endometrial durante la gestación. Estas proteínas sirven como nutrición para el embrión antes de su implantación y además inhiben la función linfocítica, incluyendo la proliferación de las células T y la activación de las células asesinas naturales (NK), lo cual podría dañar e incluso provocar el rechazo inmunológico del embrión (Hansen, 1998). La expresión del RNAm de las UTMP se encuentra restringida al epitelio glandular, manteniéndose en un menor nivel entre los días 15 a 17 de la gestación, para posteriormente incrementarse de manera paralela al desarrollo y crecimiento del producto (Spencer 2004).

En el miometrio uterino, la progesterona disminuye el tono muscular y evita la producción de contracciones intensas. Incluso se ha informado que el aumento de las concentraciones de progesterona mediante su administración exógena durante los últimos días de la gestación, puede provocar el retraso del parto hasta en 2.5 días, lo que aumenta la mortalidad fetal (Crosby et al, 2005).

Otros efectos de la progesterona están asociados con el peso al nacimiento de las crías, algunos autores indican que al existir altos niveles, se movilizan ácidos grasos y glucosa de las reservas corporales de la madre. Estos nutrientes se transportan a la circulación materna y llegan a la placenta, desde donde son aprovechados por el feto para incrementar su crecimiento (Manalu-Sumayardi, 1998).

En especies como los ratones, la progesterona desempeña un papel muy importante en la maduración de los vasos sanguíneos del endometrio, acción que va ocurriendo conforme se va desarrollando la angiogénesis (Girling et al ,2007). Tanto la progesterona como el IFNt, regulan la producción de los factores inducibles por hipoxia, los cuales están involucrados en el establecimiento de la angiogénesis placentaria y el desarrollo del concepto ovino. En ratones, se ha demostrado que la deficiencia de estos factores ocasionan defectos vasculares en el embrión y la placenta (Song et al, 2008; Bazer et al, 2008).

Al momento del parto las concentraciones de progesterona deben disminuir y las de estrógenos aumentar, favoreciendo así la síntesis de oxitocina y sus receptores, dando como resultado el incremento de las contracciones uterinas para la expulsión del producto y la estimulación de la secreción de leche por la glándula mamaria (Fang et al ,1997).

## **PLACENTACIÓN**

Durante la gestación, la placenta desarrolla diferentes funciones, como son; el intercambio de nutrientes, gases y desechos entre la madre y el feto; actúa como barrera protectora al evitar la migración celular entre estos dos compartimentos y como un órgano endócrino y parácrino temporal, que regula el desarrollo de la unidad feto placentaria e influye sobre la fisiología materna para que ésta pueda adaptarse a los cambios ocurridos durante la gestación (Gootwine, 2004).

## **Desarrollo de las membranas fetales**

Después del estadio de blastocito del embrión, éste inicia el proceso de gastrulación, mediante el cual adquiere tres capas germinales que, conocidas en conjunto como disco embrionario, se denominan de manera individual como ectodermo, mesodermo y endodermo. A partir de estas capas se originan las membranas fetales conocidas como saco vitelino, amnios, alantoides y corion (Wooding y Burton, 2008). Estas membranas son la base para la formación de las estructuras placentarias que, junto con el útero, protegen y nutren al embrión (Wooding y Burton, 2008).

### **Saco vitelino**

El saco vitelino se deriva de las células que componen el disco embrionario (o masa celular interna). Inicialmente en el disco embrionario se diferencian el ectodermo y endodermo, pero posteriormente, se formará una tercera capa a partir del endodermo, a la cual se le denominará mesodermo y se situará entre las dos primeras capas. El resultado es un saco vitelino trilaminar o de tres capas, el cual es considerado como la base para el desarrollo de las otras membranas extraembrionarias: el corion, el amnios y el alantoides (Wooding y Burton, 2008).

### **Corion, amnios y alantoides**

El crecimiento de estas membranas inicia cuando el mesodermo extraembrionario comienza a dividirse y expandirse hasta salir del embrión, rodeando al saco vitelino para formar la cavidad alantoidea. El mesodermo seguirá creciendo y junto con el

endodermo comenzará a desarrollar la vascularización embrionaria. El corion se desarrolla a partir del trofoectodermo, ya que para este momento el trofoectodermo está completamente separado de la masa celular interna. En varias especies, incluyendo los rumiantes, se pierde la porción del trofoectodermo que se encuentra sobre la masa celular interna, y en este caso, el corion emitirá prolongaciones que rodean al embrión y lo encierran, formando así el saco amniótico, el cual posteriormente se llenará de líquido para servir como medio protector del embrión contra cualquier impacto o daño externo, garantizando así su libre desarrollo y crecimiento.

Una vez que se forma el amnios, crece una vesícula endodermal desde la parte posterior del intestino embrionario para formar el saco alantoideo, el cual está cubierto desde un principio por tejido vascular mesodérmico. El crecimiento del alantoides continúa paralelo al desarrollo del sistema urogenital del feto y funciona como un sitio de deposición de desechos. Su vasta irrigación permitirá el intercambio de oxígeno y nutrientes entre la madre y el producto (Wooding y Burton, 2008).

## **CLASIFICACIÓN DE LAS PLACENTAS**

Existen varios sistemas de clasificación de las placentas. El primer tipo de clasificación se relaciona con las membranas fetales implicadas, pudiendo ser de tres tipos: coriónica, corioalantoidea o vitelina (Hafez, 2002). En las ovejas, la placenta está formada por la fusión del corion y el alantoides, por lo tanto es considerada una placenta corioalantoidea (Sammin et al, 2009).

A su vez, la placenta corioalantoidea se puede clasificar de acuerdo con la distribución de las vellosidades en la superficie del corion (Hafez, 2002). En los rumiantes las vellosidades que se distribuyen sobre el corion están agrupadas en pequeñas zonas conocidas como cotiledones. Estas vellosidades consisten en conos mesenquimatosos vasculares, rodeados por células trofoblásticas cuboides y binucleadas gigantes, las cuales se proyectan y fusionan con las carúnculas maternas, formando así los placentomas, cuyo número en las ovejas fluctúa entre 90 y 100 (Hafez, 2002; Sammin et al, 2009). Las carúnculas son estructuras especializadas de la mucosa uterina y consisten en pliegues de la superficie endometrial, de disposición longitudinal y circular, distribuidas a lo largo de los cuernos uterinos en mayor disposición (casi 40 %) en la parte central de cada uno de los cuernos y que van disminuyendo hacia los extremos de estos últimos (Dyce, 1999; Hafez, 2002).

Otra forma de clasificación placentaria es aquella basada en el método de Grosser (Carlson, 1990), el cual consiste en determinar el número de capas o tejidos interpuestos entre la circulación materna y fetal. En aquellas especies con una placentación epiteliocorial, como la yegua y la cerda, todas las capas se conservan entre ambas partes. En la placentación de tipo endotelicorial (carnívoros), se pierden el tejido conectivo y el epitelial materno, dejando en contacto al endotelio materno con el tejido coriónico fetal, mientras que en el caso de la placentación hemocorial (primates, roedores), la totalidad del corion fetal es prácticamente bañado en la sangre materna (Sammin et al, 2009). En la placenta de los rumiantes, incluyendo la ovina, el corion se encuentra separado del tejido materno por una capa sincitial, la cual está formada por células binucleadas y células híbridas, por lo que a

este tipo de placentación también se le llama sinepiteliocorial (Sammin et al, 2009).

## **CIRCULACIÓN UTERINA Y PLACENTARIA**

La arteria uterina de la oveja se origina a partir de la arteria iliaca interna, junto con la arteria umbilical (Dyce, 1999). Antes de llegar al útero la arteria uterina se divide en una rama craneal y una caudal, las cuales se dividen a su vez en otras seis ramas de menor tamaño, las cuales vascularizan las paredes del útero por medio de una serie de ramas que discurren transversalmente sobre las caras dorsal y ventral del cuerpo uterino y de los cuernos uterinos. Mientras tanto, las ramas más desarrolladas llegan hasta las carúnculas uterinas (Dyce, 1999).

El suministro de sangre a la parte materna de la placenta se produce a través de las arterias y venas uterinas. En el caso del lado fetal, la sangre desoxigenada proveniente de los tejidos fetales es llevada a la placenta por medio del sistema arterial umbilical, en donde se convierte en sangre oxigenada mediante su paso por las redes capilares de los cotiledones. Una vez oxigenada la sangre, es devuelta al feto por medio del sistema venoso umbilical (Sammin et al, 2009). En la oveja y la cabra los placentomas, presentan en su parte interna una gran cantidad de arterias centrales, las cuales a su vez se siguen ramificando, encargadas de transportar sangre desoxigenada (Wooding y Burton ,2008). Al parecer, el número de capas interpuestas entre la circulación materna y la fetal no compromete la transferencia de nutrientes y gases a través de la placenta gracias a la existencia de algunas características

morfológicas como la presencia de los capilares intraepiteliales, los cuales reducen la distancia de difusión (Sammin et al, 2009).

## **ANGIOGÉNESIS PLACENTARIA.**

El mantenimiento de la gestación depende en gran parte del intenso crecimiento y la formación de nuevos vasos sanguíneos (Reynolds et al, 2005). La circulación placentaria, evoluciona a partir de una red capilar primaria y por una sucesiva reorganización de las células endoteliales, en un proceso llamado angiogénesis (Ferrara, 2004). La angiogénesis placentaria se caracteriza por la anastomosis en las redes neovasculares. De este lecho vascular, dependerá el flujo sanguíneo umbilical y el crecimiento en sí de la placenta, pues no existe otra manera de abastecer un crecimiento tan exponencial, de no ser por la angiogénesis y el crecimiento vascular (Reynolds, 2005). Este proceso de crecimiento vascular se encuentra altamente regulado para asegurar un crecimiento continuo de la cama vascular placentaria, lo que permite un aumento estable del flujo sanguíneo necesario para la unidad feto-placentaria y el mantenimiento del crecimiento fetal (Cheung et al, 1995). En diferentes especies es necesario aumentar la permeabilidad vascular desde la fase de implantación embrionaria como un prerrequisito para inducir y direccionar el crecimiento endometrial, así como para facilitar la angiogénesis, por lo que al aumento de permeabilidad se le considera como un componente primario en la formación placentaria (Kaczmarek et al, 2009).

El lecho vascular placentario va creciendo conforme avanza la gestación, gracias al aumento del flujo sanguíneo umbilical y

uterino, lo que influye directamente sobre el incremento del intercambio transplacentario, afectando así la tasa de crecimiento fetal durante el último tercio de gestación. Por lo tanto, cualquier factor que influya sobre el desarrollo vascular placentario tendrá un impacto directo sobre el crecimiento y desarrollo fetal y en consecuencia sobre la sobrevivencia neonatal (Borowicz et al, 2007).

En los rumiantes la placentación de tipo sinepiteliocorial está conformada por numerosos placentomas, los cuales se componen de tejido materno y fetal. Estos placentomas pueden incrementar hasta cuatro veces su peso entre los días 50 a 140 de la gestación. De la misma manera el flujo sanguíneo uterino se incrementa de tres a cuatro veces durante el segundo y el tercer tercio de la gestación. Es importante mencionar que la demanda de oxígeno y nutrientes se ven incrementados de 2-4 veces partir del segundo tercio de gestación y el flujo sanguíneo es dirigido por el útero hacia el feto, manteniendo así la tasa de crecimiento fetal (Reynolds et al, 2005).

Para satisfacer esta demanda, la densidad vascular de la mucosa uterina y de las carúnculas maternas se incrementa muy rápidamente entre los días 24 a 40 de la gestación, prosigue su incremento a un menor ritmo hasta mediados de la gestación, para después mantenerse estable hasta el final de la misma. Mientras que en la contraparte cotiledonaria, la densidad vascular se mantiene constante hasta mediados de la gestación, para presentar un dramático incremento durante el último tercio (Borowicz et al, 2007). Estos datos son consistentes con el aumento del flujo umbilical, el cual se incrementa con mayor velocidad durante el

último tercio de gestación en comparación con el flujo uterino (Borowicz et al, 2007).

Diversos estudios han demostrado una correlación positiva directa entre el incremento del flujo sanguíneo umbilical y uterino con el crecimiento y peso de los placentomas. Esto es, a mayor flujo sanguíneo mayor peso de los placentomas. La importancia de la circulación placentaria, radica en su estrecha relación con el peso de la placenta y el consecuente peso del feto a lo largo de la gestación (Redmer et al, 2004).

## **FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR (VEGF)**

Si bien son numerosos los factores que participan en la angiogénesis placentaria y en el desarrollo fetal, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es considerado uno de los más potentes, ya que se asocia en la mayoría de las especies, con el crecimiento vascular placentario y fetal (Reynolds et al, 2005; Vonnahme et al, 2005). Dentro de los integrantes de la familia de VEGF, se encuentran el VEGF-A, VEGF-B, el VEGF-C, el VEGF-D y el factor de crecimiento placentario (PlGF-1). De esta familia, el VEGF-A es el más estudiado y se le refiere únicamente como VEGF (Rosales T. y Guzmán S, 2011).

El VEGF, es un agente mitógeno de las células endoteliales y promotor de permeabilidad, capaz de estimular la angiogénesis. Se asocia con el rápido crecimiento vascular en condiciones fisiológicas normales o patológicas (Houck et al, 1991; Leung et al,

1992). Es una glicoproteína secretada en forma de homodímeros de 45 kda, de carácter básico y ligada a heparina (Cheung y Brace, 1998). El gen VEGF-A codifica para 8 exones y 7 intrones (Ferrara y Davis, 1997; Ferrara, 2004), y por corte y empalme del ARNm de VEGF se originan al menos 8 diferentes isoformas, a partir de un solo gen. La nomenclatura de dichas isoformas depende del número de aminoácidos que las conforman. Así, las isoformas 121, 148, 165 y 165b son isoformas solubles, ya que son proteínas difusibles y no se ligan a la heparina; mientras que las isoformas 145, 183, 189 y 206 se encuentran unidas a la membrana y al tener una alta afinidad por la heparina, se ligan fácilmente a ella, encontrándose casi en su totalidad en la matriz extracelular (Cheung et al, 1995; Kaczmarek et al, 2009; Rosales-Torres et al, 2010). Para las especies de animales de granja, incluyendo a las ovejas, todas las proteínas derivadas de las isoformas de VEGF tiene un aminoácido menos (Rosales-Torres et al, 2010). En los ovinos se han identificado, mediante la técnica de PCR, las isoformas 120, 164, 188 y 205 tanto en los cotiledones como en el corion y amnios, siendo la isoforma 164 la más abundante (Cheung et al, 1995). En las borregas gestantes el RNAm de VEGF es fuertemente expresado en el amnios y el corion placentarios, mientras que la proteína de VEGF se puede localizar en las vellosidades del citotrofoblasto y en el tejido conectivo de la placenta (Bogic et al, 2000, Reynolds et al, 2005).

Tanto el amnios, como el corion y la superficie placentaria, están vascularizados por vasos sanguíneos fetales microscópicos, los cuales van incrementando su tamaño conforme avanza la gestación. Estos vasos intramembranosos han demostrado ser la ruta primaria de intercambio de líquido entre el compartimento

amniótico y la sangre fetal, por lo que es posible que el VEGF participe en la regulación del volumen de líquido amniótico, manteniendo así el crecimiento y la permeabilidad de los vasos sanguíneos intramembranosos. La expresión del RNAm de VEGF se va incrementando progresivamente, hasta llegar a sus más altos niveles aproximadamente al día 110 de gestación, posteriormente estos niveles se irán reduciendo hasta llegar a niveles basales para el día del parto; estas variaciones coinciden con los cambios morfológicos que ocurren en la placenta durante el mismo período de tiempo (Bogic et al, 2000, Reynolds et al, 2005).

La actividad biológica del VEGF se encuentra mediada por dos receptores tipo tirosina cinasa, conocidos como VEGF-R1 o Flt-1 y VEGF-R2 o Flk-1 o KDR-1 (Ferrara, 2004). Estos receptores contienen siete dominios extracelulares que son parecidos a los de las inmunoglobulinas, con una región transmembranal y una secuencia intracelular conservada de tirosina cinasa, interrumpida por un dominio de inserción de cinasa (Méndez, 2010).

La glicoproteína de VEGF-R1 tiene un peso de 180-KDa y posee una alta afinidad por VEGF con una Kd de 10-30 pM (Berisha et al, 2000). En las células endoteliales, este receptor es mediador de la proliferación, la quimiotaxis y la sobrevivencia celular (Méndez, 2010). Se encuentra de manera más abundante que VEGF-R2 y regula la interacción endotelial celular y la formación tubular (Wulff et al, 2002), siendo también capaz de interactuar con diferentes transductores para proteínas, generar señales mitogénicas y presenta actividad hematopoyética (Ferrara et al, 2003). Sin embargo se encuentra de manera más abundante que VEGF-R2, por lo que algunos autores sugieren que VEGF-R1 funciona como

un señuelo, que atrae a VEGF, reduciendo de ese modo el número de moléculas de VEGF disponibles para unirse a VEGF-R2 (Ferrara, 2003), por lo que podría regular la interacción endotelial celular y la formación tubular (Wulff et al, 2002), siendo también capaz de interactuar con diferentes transductores para proteínas, generar señales mitogénicas y presentar actividad hematopoyética (Ferrara et al, 2003).

VEGF-R2, tiene un peso de 200-230KDa y su Kd es de 75-125pM. Tiene una mayor afinidad hacia VEGF, ya que su capacidad de autofosforilación es 10 veces mayor en respuesta a este factor, que VEGF-R1. Por lo que este receptor es considerado como el mayor mediador de los efectos mitogénicos, angiogénicos y de permeabilidad vascular promovidos por el VEGF (Ferrara, 2003; Kaczmarek et al, 2009). VEGF-R2 también propicia la diferenciación y proliferación endotelial (Wulff et al, 2002).

Un estudio realizado a lo largo de la gestación ovina, demostró que la expresión del RNAm para ambos receptores mantiene un patrón de secreción muy diferente en carúnculas y cotiledones. En las carúnculas, la expresión de VEGF-R1 se incrementa drásticamente a lo largo de la gestación, llegando a su punto máximo en el día 140 de gestación; a diferencia de VEGF-R2, el cual llega a su punto máximo aproximadamente en el día 110 de gestación, para después ir disminuyendo hasta llegar a niveles basales al momento del parto. Por su parte, la expresión de VEGF-R1 en los cotiledones se incrementa muy poco y el VEGF-R2 no presenta cambios a lo largo de la gestación (Reynolds et al, 2005). Otro estudio realizado en placentas ovinas determinó la expresión del RNAm de VEGFR2 y su proteína en la vasculatura materna y

fetal. Dicha expresión no fue detectada en el endotelio fetal durante la gestación temprana (día 62), pero sí más adelante y de manera notable, lo que sugiere que VEGF no se involucra tanto en la proliferación celular endotelial fetal antes del día 62 de gestación, sino que en ese período el VEGF se encarga de promover en la placenta la diferenciación y proliferación celular materna (Bogic et al, 2001).

Los receptores solubles sVEGF-R1 o sflt-1 y sVEGF-R2 o sflt-1, son una variante alternativa del pre-RNA que codifica para VEGF-R1 y VEGF-R2, con un peso molecular de entre 90-100kda y de 160kda, respectivamente. Estos receptores carecen de la región transmembranal e intracelular, están conformados por 6 dominios parecidos a inmunoglobinas que conforman la región extracelular, la cual está directamente involucrada con la interacción con VEGF (Méndez, 2010). Estas moléculas solubles compiten con los receptores de membrana VEGF-R1 y VEGF-R2 para ligarse con VEGF y PlGF (Hastings et al, 2003), es decir, actúan como inhibidores de la angiogénesis al secuestrar a VEGF e impedir su interacción con VEGF-R1 y VEGF-R2, obstaculizando así la acción biológica del ligando, con lo que se reduce la mitogénesis de las células endoteliales y la permeabilidad vascular (Ebos et al, 2004; Méndez, 2010). En humanos, la placenta es una de las principales fuentes del sVEGF-R1, ya que incrementa al menos 20 veces en la circulación materna durante el último tercio de gestación y posteriormente disminuyen rápidamente después del parto (Shibata et al 2005).

En cuanto a la regulación de la expresión genética del VEGF, la hipoxia juega un papel importante en su estimulación (Ferrara y

Davis, 1997; Ferrara, 2004). Factores de crecimiento como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de necrosis tumoral (TNF), el factor de crecimiento transformante (TGF), el factor de crecimiento de queranocitos (KGF), así como las citocinas relacionadas con la inflamación (interleucinas 1 y 6), inducen la expresión de VEGF en varios tipos celulares. Algunas hormonas también son reguladores importantes de la expresión de VEGF, entre éstas se encuentran la hormona estimulante de la tiroides (TSH), la hormona adrenocorticotropica (ACTH), las gonadotropinas y los esteroides sexuales (Ferrara, 2004).

## **FACTOR DE CRECIMIENTO PLACENTARIO (PIGF)**

El factor de crecimiento placentario (PIGF) es un miembro de la familia de VEGF y su estructura es hasta un 53% homóloga a la de VEGF (Malamitsi-Puchner et al, 2005). En humanos se ha visto que PIGF es expresado de manera abundante en la placenta y las células del trofoblasto (Yang et al, 2003).

Mediante el corte y empalme del ARNm , se obtienen cuatro isoformas diferentes: PIGF-1, PIGF-2, PIGF-3 y PIGF-4, compuestas por 131, 152, 203 y 224 aminoácidos, respectivamente. La principal diferencia entre estas isoformas es que PIGF-1 y PIGF-3 no poseen dominios que puedan ligarse a la heparina, mientras que PIGF-2 y PIGF-4 poseen varios dominios para ligarse a ésta (Yang et al, 2003; Errico et al, 2004; De Falco, 2012). Hasta el momento no se han definido las diferentes funciones que ejercen cada una de las isoformas de PIGF, pero si se sabe que éstas son producidas por el

trofoblasto y son cruciales para entender la biodisponibilidad, así como del sitio de acción de PIGF. También se sabe que PIGF-1 y PIGF-3, son capaces de afectar a las células diana de manera parácrina, mientras que PIGF-2, afectan a las células de forma autócrina (Yang et al, 2003).

Para desempeñar su actividad biológica, el PIGF tiene una alta afinidad por el VEGF-R1 (receptor de VEGF), sin mostrar interacción alguna con el VEGF-R2 (Park et al, 1994). A pesar de esta especificidad del PIGF por el VEGF-R1, se piensa que el PIGF puede activar de manera indirecta al VEGF-R2, ya que su afinidad por VEGF-R1 ocasiona un desplazamiento de VEGF-A hacia VEGF-R2, incrementando así su afinidad hacia este último. Otra posibilidad es que si se expresaran tanto VEGF como PIGF en una misma célula, pueden formar un heterodímero capaz de ligarse y activar a VEGF-R1, pero también de inducir la dimerización y por tanto, nuevas propiedades de ambos receptores (VEGF-R1 y VEGF-R2) (Park et al, 1994; Malamitsi-Puchner et al, 2005; De Falco, 2012). Lo anterior originaría una respuesta angiogénica mayor a la esperada, lo que explicaría el que algunos estudios *in vitro* sugieran que PIGF puede potencializar la acción de VEGF (Park et al, 1994; Ahmed et al, 2000; Autiero et al, 2003).

Esto porque PIGF de manera solitaria es un factor con una débil respuesta al estimular la quimiotaxis y proliferación de las células endoteliales, en concentraciones fisiológicas normales. En ratones, su ausencia no compromete el desarrollo embrionario, e incluso la cría nace saludable y fértil (De Falco, 2012). Sin embargo, en ratones adultos el Knock out de PIGF, perjudica la angiogénesis y arteriogénesis en condiciones patológicas, como en

los crecimientos tumorales, en corazón y en la isquemia ocular (De Falco 2012).

El PIGF se expresa durante el desarrollo embrionario temprano. En roedores este factor es abundante en las células gigantes del trofoblasto que están asociadas a la pared del saco vitelino, por lo que se cree que podría desempeñar un papel fundamental en la coordinación de la vascularización placentaria (De Falco, 2012). El PIGF también ha sido identificado en tejidos placentarios de especies como las ovejas, en donde la expresión de VEGF y PIGF en carúnculas y cotiledones aumenta conforme la gestación avanza, relacionando a ambos factores con el crecimiento vascular placentario (Regnault et al, 2002). En humanos se ha demostrado una abundante expresión de PIGF por las células del trofoblasto (Krauss et al, 2004), y se ha determinado que la expresión tanto de VEGF, PIGF y sus receptores, son diferentes a lo largo de la gestación. El VEGF y el VEG-R2 tienen una mayor expresión durante los primeros dos trimestres de gestación, por lo que es posible que se involucren en el establecimiento de las camas capilares del mesenquima y de las vellosidades intermedias inmaduras; mientras que el PIGF y el VEGF-R1, incrementan su expresión en el último tercio de gestación, para finalizar la formación y la maduración capilar (Ahmed et al, 2000; Malamitsi-Puchner et al, 2005).

En cuanto a su regulación, algunas investigaciones sugieren que el oxígeno es el principal regulador del balance entre las funciones de VEGF y PIGF, sin embargo, algunos estudios indican la presencia de grandes cantidades de PIGF en aquellas células expuestas a condiciones hipóxicas, sin embargo, la región

potencializadora de PIGF no demuestra la presencia de alguna secuencia del gen conocido como Elemento Sensible a Hipoxia (HRE) como se observa para VEGF-A y VEGF-R1. Sin embargo esta región de PIGF presenta varias secuencias de reconocimiento para los Factores e transcripción de respuesta a Metales 1 (MTF-1) y para el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B) .Ya que en diferentes experimentos relacionados con estos factores sobre fibroblastos de embrión de ratón y sobre células renales de embrión humano en condiciones hipóxicas, se demostró que la expresión de PIGF se puede regular a través de estos factores(De Falco 2012). Sin embargo, la sobreexpresión de HIF-1 en las células endoteliales o en células cardiacas influye positivamente en la expresión de PIGF (Yamakawa et al, 2003; De Falco, 2012). Por el contrario, otros estudios mencionan que en algunas patologías, el PIGF estimula su expresión en condiciones de hiperoxia y que esta expresión decrece en condiciones de hipoxia, mientras que VEGF y sus receptores se encuentran regulados de manera creciente por condiciones hipóxicas (Malamitsi-Puchner et al, 2005; Shibata et al, 2005).

Cabe mencionar que PIGF es también expresado de manera fisiológica normal, pero en menor concentración, en otros órganos, como; el corazón, pulmón, glándula tiroides, músculo esquelético y tejido adiposo.

## GESTACIONES INTERESPECIES

Una gestación interespecie es aquella presentada entre individuos de diferentes especies. Por lo general, este tipo de gestaciones se llevan a cabo con fines de investigación para la conservación de una especie, así como con fines académicos, para poder estudiar la fisiología y comportamiento de los diversos factores que son de suma importancia para que sea exitosa una gestación y que por lo regular se presentan de diferente manera en comparación con una gestación normal de cualquiera de las diferentes especies que se están cruzando. Además los híbridos mamíferos tienen un gran potencial para el estudio de la impronta genética, así como para conocer las diferencias bioquímicas, fenotípicas y endocrinológicas entre las diferentes especies (Allen et al, 1993). Por ejemplo; dentro de las gestaciones interespecie más estudiadas, se encuentran aquellas establecidas entre équidos (*Equus ferus X Equus africanus*).

Un claro ejemplo del control que poseen los genes improntados sobre el desarrollo placentario y la producción de sus hormonas placentarias, es aquel ocurrido entre gestaciones interespecie de yeguas cargadas con semen de burro, y burras cargadas con semen de caballo, ya que al analizar las membranas coriónicas y el desarrollo de las copas endometriales es mucho mayor en el útero de la burra, en comparación con el útero de la yegua. Hechos consistentes al presentarse una gestación interespecie entre una burra con un caballo, donde se observa el gran desarrollo de las copas endometriales en comparación con aquellas presentadas en las yeguas cargadas con semen de burro, en donde el poco desarrollo del corion junto con una nula formación

de las copas endometriales, ocasiona la pérdida de la gestación antes del día 100 (Allen et al, 1993). Estos hechos sugieren que el útero de la burra es más permisivo que el útero de la yegua, en términos de aceptar algún embrión externo o diferente a su especie (Allen et al 1993). En cuestiones hormonales, cuando una yegua está gestante de un burro, las copas endometriales derivadas de las células coriónicas del embrión, son rápidamente rechazadas por la yegua, por lo que las concentraciones de la Gonadotropina Coriónica equina (eCG) incrementan un poco entre el día 40-60 de gestación, después irán disminuyendo hasta alcanzar niveles indetectables entre la semana 7 y 11 de gestación. Esta falta de soporte de gonadotrópico resultará en una baja actividad de los cuerpos lúteos de la gestación y por consiguiente, bajas concentraciones de progesterona, lo que puede aumentar la incidencia de abortos (Boeta y Zarco 2010). Por lo que la producción de este tipo de gestaciones interespecie, puede ser utilizada como modelo natural para obtener información respecto al papel que desempeña la hormona eCG (Boeta y Zarco 2012).

En otros trabajos realizados sobre gestaciones interespecie, se concluyó que no es posible transferir un embrión puro de Cabra Ibérica Española a una cabra doméstica, ya que ésta gestación no llega a término (Fernández Arias et al, 1999). Sin embargo, cuando se emplearon híbridos como receptores de embriones puros de cabra ibérica, si es posible obtener crías viables (Fernández Arias et al, 2001). Además en este estudio se demostró que existen diferencias anatómicas e histológicas en una gestación interespecie de este tipo en comparación con las gestaciones normales de cualquiera de las otras dos especies. Ya que la longitud de las vellosidades placentarias es mayor en este tipo de gestaciones

interespecie, las células BNC son más grandes, y la concentración de la glicoproteína asociada a la gestación (PAG), es mayor en las gestaciones interespecie de este tipo (Fernández Arias et al, 2001).

Otro trabajo importante sobre gestaciones interespecie, fue el realizado con fines de conservación del Visón Europeo, en donde se produjeron crías F1 cruce de Visón Europeo con un Hurón doméstico, dando como resultado individuos F1 sanos y fértiles. Estos individuos fueron utilizados como receptores de embriones puros de Visón Europeo, teniendo como resultado final la sobrevivencia del 25% del total de los embriones transferidos, lo que abre una ventana a la investigación y conservación del Visón Europeo, el cual se encuentra en peligro de extinción (Amstislavsky et al, 2004).

En cuanto a los trabajos realizados en gestaciones interespecies *Ovis aries X Ovis Canadensis*, Delgadillo et al (2003) determinaron y compararon por primera vez el número diploide (2n) y morfología cromosómica del borrego híbrido producto de la cruce entre borrego Cimarrón (*Ovis canadensis*) y borrego doméstico (*Ovis aries*), dando a conocer que el híbrido de esta cruce es fértil y el arreglo cromosómico de las dos especies y el híbrido es igual; ya que tienen un número cromosómico de  $2n=54$ , formado por tres pares de submetacéntricos grandes y 23 pares de cromosomas acrocéntricos que varían en tamaño.

Por otro lado, Calderón(2009), realizó un seguimiento de las concentraciones de progesterona y describió la morfología e histología placentaria de tres diferentes tipos de gestaciones; una gestación intraespecífica de oveja doméstica, una gestación

intraespecífica de una borrega cimarrón, y una gestación interespecífica producto de la cruce de oveja doméstica, con borrego cimarrón. En sus resultados encontró mayores concentraciones de progesterona en las gestaciones domésticas a partir de la semana 17, en comparación con las crías híbridas ( $P < 0.05$ ). La longitud de las placentas, su peso y el diámetro de los cotiledones fue menor en las placentas de crías híbridas, comparadas con los otros dos grupos ( $P < 0.05$ ), se observó de manera cualitativa un menor grosor y vascularización en las placentas de las crías híbridas en comparación con los otros dos grupos, además de que las crías híbridas presentaron un menor tamaño y peso en comparación con las crías domésticas ( $P < 0.05$ ), y finalmente, a través de microfotografías, se observó una menor cantidad de células binucleadas en las gestaciones híbridas en comparación con los otros dos grupos.

### III. JUSTIFICACIÓN

La utilización de técnicas de reproducción asistida en fauna silvestre ha sido contemplada como una herramienta en la conservación de especies amenazadas. Sin embargo, se desconocen las características fisiológicas y endocrinológicas de los modelos de gestaciones interespecies, ya que pocos han sido exitosos. Basado en lo anterior, son numerosos los factores relacionados con el desarrollo placentario y fetal, por lo que es necesario conocer el papel que juega la P4, el VEGF y el PIGF en el desarrollo de la vascularización placentaria, así como comparar la concentración de estos factores a lo largo de gestaciones intraespecies de ovejas domésticas con gestaciones interespecies híbridas (*Ovis aries* x *Ovis canadensis*) donde se ha visto que el tamaño placentario y fetal se encuentra limitado.

### IV. HIPOTESIS

Debido a que P4, VEGF y PIGF son importantes para el desarrollo placentario y a que en gestaciones híbridas de *Ovis aries* con *Ovis canadensis* se han observado fallas en la placentación, se plantea que en este tipo de gestaciones habrá una menor producción de P4, VEGF y PIGF, lo cual puede estar asociado con el inadecuado desarrollo placentario y bajo peso al nacimiento de las crías producto.

## V. OBJETIVOS

### **Objetivo general.**

Determinar las concentraciones de progesterona, VEGF y PIGF-1 durante la gestación interespecífica (*Ovis aries* X *Ovis canadensis*) y comparar estas concentraciones con aquellas obtenidas durante gestaciones normales de ovejas domésticas, evaluando su relación con el desarrollo placentario y fetal.

### **Objetivos específicos.**

- Determinar y comparar las concentraciones de progesterona, VEGF y PIGF-1 en gestaciones interespecíficas (*Ovis aries* X *Ovis canadensis*) o intraespecíficas (*O. aries* X *O. aries*).
- Comparar las dimensiones de la placenta y de los cotiledones al parto en gestaciones interespecíficas (*Ovis aries* X *Ovis canadensis*) o intraespecíficas (*O. aries* X *O. aries*).
- Determinar las características morfométricas y el peso de las crías al nacimiento producto de gestaciones inter o intraespecíficas.

## **VI. MATERIAL Y METODOS**

### **Localización y animales**

El presente trabajo se realizó en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Ovina (CEIEPO) ubicado en Tres Marías, Morelos. Así como en el Departamento de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM).

Inicialmente se utilizaron 20 borregas adultas de la raza Suffolk para formar dos grupos de hembras gestantes. El grupo 1 (gestación doméstica) se conformó por 10 borregas suffolk inseminadas con semen de borrego doméstico y el grupo 2 (gestación híbrida) por 10 borregas suffolk inseminadas con semen de Cimarrón. Se contó finalmente con seis hembras gestantes por grupo.

### **Sincronización e inseminación artificial**

La sincronización de las ovejas de ambos grupos se realizó mediante la colocación intravaginal de CIDR's con 300 mg de progesterona natural (Eazi-Breed© CIDR©, Inter Ag, Nueva Zelanda), los cuales permanecieron durante 11 días y al momento del retiro del dispositivo se administraron intramuscularmente 100 UI de gonadotropina coriónica equina (Folligon, Intervet México).

Se realizó la inseminación artificial intrauterina mediante laparoscopia, entre las 56 y las 60 horas posteriores al retiro del

CIDR y la administración de eCG. Las ovejas fueron privadas de agua y alimento durante las 24 horas anteriores a la inseminación. Se anestesiaron con 0.45 mg/kg de xilacina al 10 % (Sedazine, Fort Dodge, USA) y 1 mg/kg de ketamina (Anesket, Pisa, México). Una vez anestesiadas, se esquiló la lana cercana a la ubre y se lavó la región abdominal con jabón quirúrgico, y se desinfectó con benzal. Se colocaron en una mesa para inseminación intrauterina en posición de decúbito dorsal (posición de Trendelenburg modificada) y se introdujo una aguja de Veress para insuflar la cavidad abdominal. Posteriormente se realizaron dos incisiones, aproximadamente a 4 cm a cada lado de la línea media y por debajo de la ubre, insertando dos trócares con cánulas de 5 mm de diámetro, por una de ellas, se introdujo un laparoscopio recto de 5 mm de diámetro para la visualización del útero y por la otra cánula, se introdujo el aplicador para semen, inseminando cada uno de los cuernos uterinos con una dosis de semen de borrego doméstico (grupo 1) o Cimarrón (grupo 2) con  $100 \times 10^6$  de espermatozoides, envasado en pajillas de 0.25ml. Finalizada la inseminación se suturaron las incisiones, se administraron por vía endovenosa 2.2 mg/kg de peso vivo de meglumina de flunixin como analgésico y desinflamatorio no esteroideal (Finadyne, Schering-Plough, México) y durante siete días se administró por vía intramuscular clorhidrato de ceftiour (1mg/kg) como antibiótico (Killen y Caffery, 1982; Maxwell, 1986).

## **Diagnóstico de Gestación**

Entre los días 15 y 19 después de la inseminación artificial, se verificó el no retorno al estro, utilizando machos enteros cubiertos con un mandil. A las borregas que no retornaron al estro, se les realizó en el día 37 post inseminación una ultrasonografía de imagen y tiempo real, utilizando un transductor lineal de 7.5 Mhz y 40 mm de longitud, el cual se introdujo rectalmente para verificar la presencia de vesículas embrionarias, el latido cardiaco del feto en formación y el desarrollo de los placentomas (Quintela et al, 1999; Martínez-Rojero, 1999; Yotov, 2005).

## **Muestras sanguíneas**

Se inició la toma de muestras de sangre a partir del día en que se confirmó el diagnóstico de gestación y se continuó una vez por semana hasta el momento del parto.

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción yugular, utilizando agujas y tubos Vacutainer de 7 ml. Una vez tomadas las muestras, se colocaron en una gradilla de laboratorio y se dejaron reposar por al menos 30 minutos. Pasado este tiempo, se centrifugaron por dos minutos a 2,500 rpm para después separar el suero, envasarlo y conservarlo a -20°C hasta su análisis en el laboratorio. La técnica de RIA para determinar las concentraciones séricas de Progesterona y ELISA para determinar las concentraciones séricas de VEGF y PIGF-1.

## **Procesamiento de las muestras**

### ***Radioinmunoensayo***

La progesterona se determinó por duplicado en un solo ensayo, tomando 100 µl del suero obtenido de las muestras sanguíneas. Para ello se utilizó un estuche comercial (Coat-A-Count Progesterona) de radioinmunoensayo en fase sólida, siguiendo el método descrito por el fabricante. La sensibilidad del ensayo fue de 0.1 ng/ml y el coeficiente de variación intraensayo fue de 3.6%.

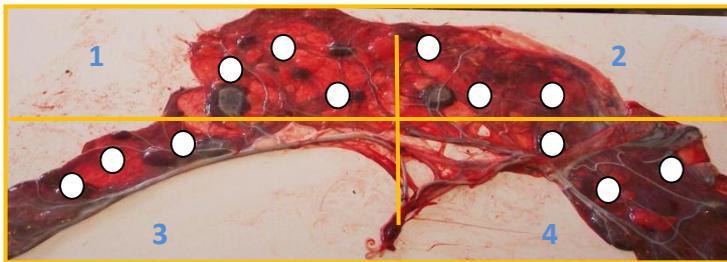
### ***Enzimo-inmunoanálisis (ELISA)***

Para la determinación de las concentraciones séricas del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) se realizó un ensayo tipo sándwich directamente proporcional y se siguieron las instrucciones del fabricante (PEPROTECH® Human VEGF No.cat 900 K-10, lote #0709019). Este kit detecta la isoforma VEGF<sup>121</sup> humana. La sensibilidad del ensayo fue de 30 pg/ml, con un coeficiente de variación intraensayo de 9.7%.

Para la determinación de las concentraciones séricas del factor de crecimiento placentario (PIGF-1) se realizó un ensayo tipo sándwich directamente proporcional y se siguieron las indicaciones del fabricante (PEPROTECH® Human PIGF-1 No.Cat 900 K-307, LOTE # 0605307). En el caso de PIGF-1, el límite de detección fue de 61 pg/ml y el coeficiente de variación intraensayo fue menor al 10%.

## Morfometría de las placentas

Las placentas que se recuperaron al parto fueron extendidas en una mesa, se extendieron para medir su longitud a lo largo y a lo ancho, además de dividir su superficie en cuatro cuadrantes (figura a). De cada uno de ellos se obtuvieron tres cotiledones aleatoriamente, a los cuales se les midió el diámetro mayor y el diámetro perpendicular al eje mayor para obtener el diámetro promedio (figura b), con el cual se calculó el área de contacto mediante la fórmula  $A = \pi r^2$ . Finalmente, se contaron la totalidad de los cotiledones de la placenta (Penninga y Longo, 1998; Schmidt, 2005; Parraguez et al, 2006) y se obtuvo el área cotiledonaria total multiplicando el área promedio de cada cotiledón por el número total de cotiledones.



**Figura a.-** División de la placenta en cuatro cuadrantes. Señalización de los cotiledones medidos por cuadrante.



**Figura b-** Medición de los ejes longitudinal mayor y perpendicular de los cotiledones placentarios.

## **Morfometría de las crías**

Al parto, las crías fueron pesadas con una báscula de reloj y se determinó su longitud cráneo-caudal, craneal, de las extremidades anteriores abarcando desde la región inter-escapular hasta el suelo, de las extremidades posteriores considerando de la punta del ilion hasta el suelo y por último, se midió la distancia entre el pliegue ano-caudal y la punta de la cola (Romualdo et al, 2004)

## **Análisis estadístico**

Para las concentraciones de progesterona, VEGF y PIGF-1, los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías (tipo de cruce vs. semana o tercio de gestación) seguida de la prueba de Bonferroni (Blanca-Mena, 2004; Ducoing ,2009).

Para comparar en cada cruce la existencia de cambios en las concentraciones de progesterona, VEGF y PLGF a través de los tercios de la gestación, los datos se analizaron mediante ANOVA seguida de la prueba de Tukey (Blanca-Mena, 2004; Ducoing ,2009).

Para calcular el área cotiledonaria total, los datos se analizaron mediante una t de Student no pareada de una cola (Ducoing ,2009).

Para el análisis de las variables longitud de la gestación, peso y características morfométricas de las crías al nacimiento, se utilizaron pruebas de distribución normal (Shapiro-Wilk) y de

homogeneidad de varianzas (Levene). Después se aplicó la prueba de Bonferroni.

Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  EE (error estándar de la media). Los valores de la probabilidad menores a 0.05 ( $P < 0.05$ ) fueron considerados estadísticamente significativos.

## VII. RESULTADOS

### **Efecto del grupo 1 y 2 (doméstico e híbrido), sobre las concentraciones séricas de progesterona a lo largo de la gestación**

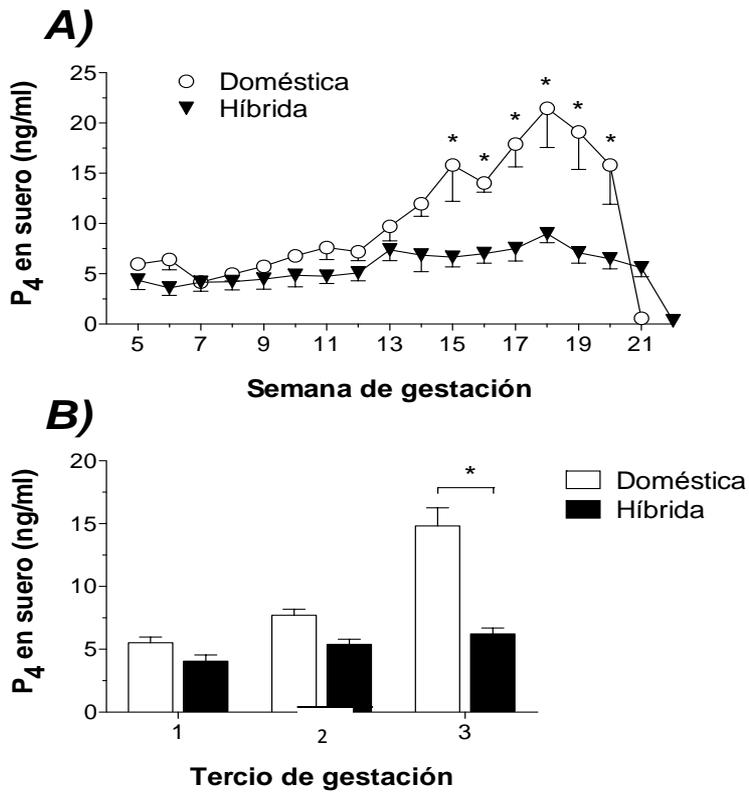
El perfil de progesterona medido semanalmente a lo largo de la gestación del grupo 1 y 2 se presenta en la **Figura 1 (panel A)**. De la semana 5-14 no se observaron diferencias entre ambos grupos ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, a partir de la semana 15 y hasta el final de la gestación, las concentraciones del grupo 1 se incrementaron de manera exponencial ( $p < 0.05$ ), resultados consistentes con el último tercio de gestación de la **Figura 1 (panel B)** en donde se aprecia este incremento de la concentración de progesterona, correspondiente a 2.4 veces más, que en el grupo 2 ( $p < 0.05$ ), el cual se mantiene constante a lo largo de toda la gestación.

### **Efecto del grupo 1 y 2 (doméstico e híbrido), sobre las concentraciones séricas de VEGF a lo largo de la gestación**

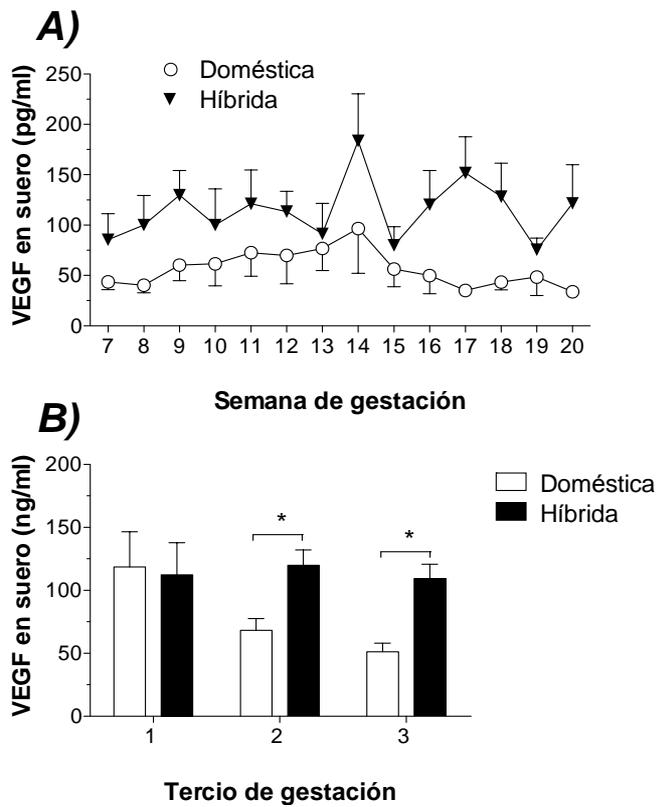
El perfil de VEGF medido semanalmente a lo largo de la gestación del grupo 1 ó grupo 2 se presenta en la **Figura 2 (panel A)**. Los resultados demuestran que no hay diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en las concentraciones de VEGF entre ambos grupos, mientras que la comparación por tercio de gestación, indicó que durante los dos últimos tercios, el grupo 2 presenta una concentración mayor de VEGF ( $p < 0.05$ ), **Figura 2 (panel B)**.

### **Efecto del grupo 1 y 2 (doméstico e híbrido), sobre las concentraciones séricas de PIGF a lo largo de la gestación**

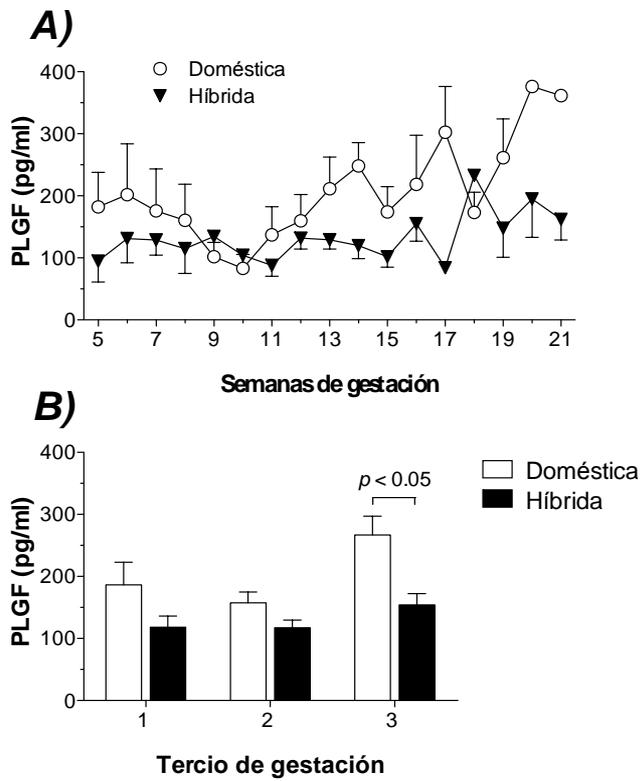
El perfil semanal de la concentración de PIGF a lo largo de la gestación del grupo 1 y 2 se presenta en la **Figura 3 (panel A)**. Los resultados demuestran que no hay diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en las concentraciones de VEGF entre ambos grupos. Sin embargo, al evaluar este factor por tercios de gestación, se observa un incremento significativo en el último tercio en el grupo 1 sobre los demás tercios y sobre el grupo 2. **Figura 3 (panel B)**; ( $p < 0.05$ ).



**Figura 1.** Cambios en la concentración de **progesterona** sérica en el grupo 1 y grupo 2. A) Perfil semanal de la concentración de progesterona y B) diagramas de barras de la concentración de progesterona por tercio de gestación de acuerdo al tipo de grupo. \* Indica diferencias significativas al nivel de  $p < 0.05$  entre grupos para cada periodo de tiempo.



**Figura 2.** Cambios en la concentración de **VEGF** en el grupo 1 y grupo 2. A) Perfil semanal de la concentración de VEGF y B) diagramas de barras de la concentración de VEGF por tercio de gestación de acuerdo al tipo de grupo. \* Indica diferencias significativas al nivel de  $p < 0.05$  entre grupos para cada periodo de tiempo.



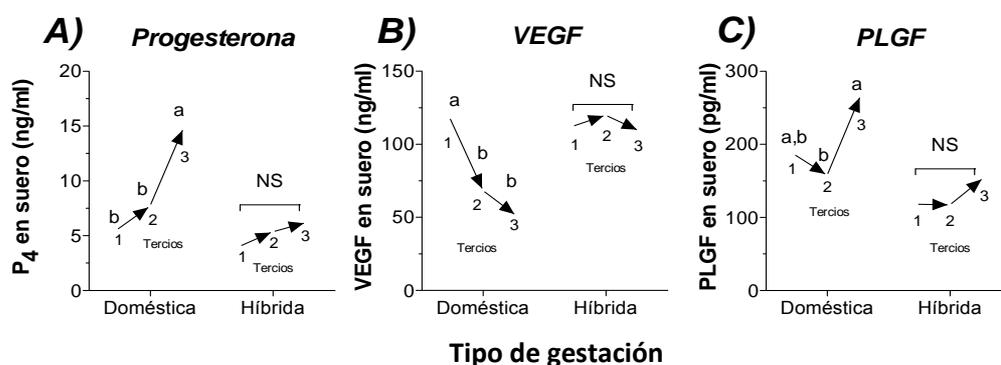
**Figura 3.** Cambios en la concentración de **PIGF** en el grupo 1 y grupo 2. A) Perfil semanal de la concentración de PIGF y B) diagramas de barras de la concentración de PIGF por tercio de gestación de acuerdo al tipo de grupo. \* Indica diferencias significativas al nivel de  $p < 0.05$  entre los grupos para cada periodo de tiempo.

Con la finalidad de comprobar en cada tipo de gestación, la existencia de cambios en las concentraciones de progesterona, el VEGF y el PIGF a través de los tercios de gestación, se realizaron graficas antes-después **Figura 4**. Esta representación brinda una evaluación de los cambios ocurridos a lo largo de mediciones consecutivas, ya que el sentido de la flecha indica la dirección del cambio, mientras que la magnitud del cambio es representada por la longitud de la flecha.

En el grupo 1 se presentó un incremento en progesterona durante el último tercio, equivalente a 2.7 y 1.9 veces la concentración medida en el primer y segundo tercio, respectivamente (**panel A**;  $p < 0.05$ ). En contraste, el grupo 2 presentó concentraciones similares durante los tercios de gestación (**panel A**;  $p > 0.05$ ).

Para el grupo 1, la concentración de VEGF circulante presentó, a partir del segundo tercio, una disminución significativa y sostenida (**panel B**;  $p < 0.05$ ). Caso contrario para el grupo 2, en donde los valores de VEGF se mantuvieron sin cambios a lo largo de la gestación (**panel B**;  $p > 0.05$ ).

El PIGF medido durante la gestación del grupo 2 no se modificó. A diferencia del grupo 1, que presentaron concentraciones distintas del PIGF durante el segundo y último tercio de gestación (**panel C**;  $p < 0.05$ ).



**Figura 4.** Gráficas antes-después de la concentración de A) Progesterona B) VEGF C) PLGF medidos para cada tipo de grupo de acuerdo a los tercios de gestación. **a,b** ; Literales distintas entre los tercios para cada grupo, indican diferencias significativas al nivel de  $p < 0.05$ . **NS** indica no significativo.

**Efecto del grupo 1 y 2 (doméstico e híbrido) sobre el tiempo de gestación, las características de la placenta y la morfometría de las crías**

De las 10 borregas Suffolk inseminadas en cada grupo, únicamente se obtuvieron 6 borregas gestantes de cada grupo. De éstas, las ovejas del grupo 2 presentaron una gestación más larga que las del grupo 1 ( $153 \pm 0.9$  vs.  $147 \pm 0.8$  días, respectivamente;  $p < 0.05$ ).

En el **Cuadro 1** se presenta un resumen de la morfometría placentaria de ambos grupos. El número total de cotiledones fue similar en ambos grupos ( $p > 0.05$ ). No obstante, el área ocupada por cada cotiledón resultó significativamente mayor en las placentas obtenidas del grupo 1 ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, cuando se

determinó el área cotiledonaria total, es decir; la cantidad total de área ocupada por los cotiledones dentro de la placenta, las ovejas del grupo 1 presentaron un área cotiledonaria 3 veces mayor que el grupo 2 ( $p < 0.05$ ).

Con respecto a la morfometría de las crías, las que nacieron de las ovejas del grupo 1 presentaron un mayor peso ( $p < 0.05$ ) y un mayor tamaño, a juzgar por las medidas que se presentan en el **Cuadro 2**.

**Cuadro 1.** Características morfométricas de la placenta de ovejas del grupo 1 y grupo 2.

Grupo	Medidas placentarias		Número de cotiledones	Área de cotiledón mm <sup>2</sup>	Área cotiledonaria total mm <sup>2</sup>
	Longitud cm	Ancho cm			
<b>1</b>	94.1 ± 17.3	30.5 ± 15.9	72.8 ± 10.3	9.2 ± 1.1	669.7
<b>2</b>	69.4 ± 19.0	17.4 ± 3.1	56.8 ± 6.7	3.9 ± 0.5	221.5
<b>P</b>	<b>&lt; 0.05</b>	<b>&gt; 0.05</b>	<b>&lt; 0.05</b>	<b>&lt; 0.05</b>	<b>&lt; 0.05</b>

Se estimó un nivel de  $p < 0.05$  para considerar una diferencia como significativa.

**Cuadro 2.** Características morfométricas de las crías nacidas de ovejas del grupo 1 ó grupo 2.

<b>G R U P O</b>	<b>Peso (kg)</b>	<b>Longitud craneal</b>	<b>Longitud cráneo- caudal</b>	<b>Longitud miembro anterior</b>	<b>Longitud miembro posterior</b>	<b>Longitud Pliegue anal- punta de la cola</b>	<b>No. De Vertebras de la cola</b>
<b>1</b>	4.6 ± 0.2	16.0 ± 0.3	73.3 ± 1.2	41.9 ± 0.5	39 ± 1.2	16.0 ± 0.3	16
<b>2</b>	2.1 ± 0.1	15.1 ± 0.4	62.4 ± 1.9	34.5 ± 1.0	31.1 ± 1.9	15.1 ± 0.4	8
<b>P</b>	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05

Se estimó un nivel de  $p < 0.05$  para considerar una diferencia como significativa.

## **VIII. DISCUSIÓN**

En el presente trabajo, se logró demostrar que el PIGF-1 y la hormona progesterona cumplen con lo establecido por la hipótesis, es decir, se encontraron reducidas sus concentraciones en el grupo 2, en comparación con el grupo 1, lo que podría asociarse con un inadecuado desarrollo placentario y bajo peso al nacimiento de las crías. Sin embargo para el caso de VEGF, se observó la presencia de mayores concentraciones de este factor en el grupo 2, en comparación con el grupo 1.

### **Concentraciones séricas de los diferentes factores analizados**

#### **Progesterona.**

En el presente trabajo se encontró que las concentraciones séricas de progesterona del grupo 1 fueron a partir de la semana 14, superiores a las obtenidas por el grupo 2, y con un patrón de secreción similar al descrito anteriormente en ovejas domésticas (Ranilla et al, 1994), ya que también se observa en el último tercio de gestación un marcado incremento de esta hormona.

Sin embargo, en el grupo 2, las concentraciones de progesterona no se incrementaron en forma significativa conforme avanzó la gestación, algo que ya había sido determinado anteriormente en este tipo de gestaciones interespecies (Calderón et al, 2009; Mejía et al, 2011). Como resultado, durante el último tercio de la gestación en el presente trabajo, las concentraciones de progesterona fueron

muy inferiores en gestaciones híbridas comparadas con las domésticas. Es importante recordar que en la oveja, la placenta comienza a secretar cantidades importantes de progesterona (>10ng/ml) a partir de mediados del segundo tercio y hasta el final de la gestación, ( Manalu y Sumaryadi,1998; Calderón, 2009), tiempo mediante el cual ocurre el crecimiento exponencial de los placentomas y del feto ( Hansen P.J, 1998; Spencer et al ,2004), por lo que la falta de un incremento en las concentraciones de progesterona durante el segundo y tercer tercio de la gestación del grupo 2, podría estar relacionado con un reducido desarrollo placentario ó con crías de bajo peso al nacimiento. Relacionando las concentraciones de progesterona con el desarrollo de la placenta Mark et al (2006) encontraron que en ratas, la reducción de la progesterona circulante al final de la gestación, reduce el crecimiento placentario y fetal. Resultados similares encontrados en cerdos, donde Razdam et al (2004), demostraron que existe una correlación positiva entra la cantidad de progesterona secretada y el tamaño placentario en cerdas con alimentación controlada, ya que al administrar progesterona exógena durante los primeros 30 días de gestación, aumentaba el tamaño placentario.

Sin embargo, sería conveniente investigar si la deficiente producción de progesterona en el grupo 2 es la causa o la consecuencia del insuficiente desarrollo placentario.

En otras gestaciones híbridas, por ejemplo entre equinos, se ha determinado que el genotipo fetal puede afectar la secreción de diferentes hormonas durante la gestación. Así, el genotipo fetal afecta la secreción de la gonadotropina coriónica equina (eCG), ya que cuando una yegua gesta una cría híbrida producto de la monta con un burro, su producción es menor y su patrón de secreción es diferente (Allen *et al.* 2003). Se conoce ahora, que esto se debe a

que la gestación de las crías mula origina una deficiente formación de las copas endometriales y por tanto, la secreción de menores concentraciones de gonadotropina coriónica equina (eCG) (Boeta y Zarco, 2010, 2012). La deficiente secreción de eCG en gestaciones mulares resulta también en menores concentraciones de progesterona debido a la falta de soporte gonadotrópico en este tipo de gestaciones (Boeta y Zarco, 2012).

Se conoce también que las concentraciones de progesterona a lo largo de la gestación, pueden ejercer un efecto importante sobre las características morfométricas de las crías. Manalu-Sumayardi (1998) encontró que los altos niveles de progesterona circulante, permiten la movilización de ácidos grasos y de glucosa de las reservas del cuerpo de la madre, los cuales se transportan a la circulación materna y llegan a la placenta, en donde son utilizados por el feto para su crecimiento, por lo que de no haber suficiente progesterona, es posible que se afecte el tamaño y peso de las crías, como lo ocurrido en el presente estudio.

### **VEGF y PIGF-1.**

Contrario a lo que se esperaba encontrar a lo largo de una gestación interespecies (*Ovis aries* x *Ovis canadensis*) como la aquí estudiada, los niveles séricos de VEGF durante el primer tercio de la gestación, fueron similares a los de las gestaciones intraespecíficas (*Ovis aries* x *Ovis aries*). En cambio, durante el segundo y tercer tercios, los niveles de VEGF permanecieron elevados en las gestaciones híbridas, mientras que en las gestaciones domésticas presentaron un significativo decremento en relación al primer tercio.

Esto es similar a los incrementos anormales de los niveles plasmáticos de glicoproteínas asociadas a la gestación (PAG) que se presentan en las gestaciones de los híbridos entre Ibex (*Capra pyrenaica pyrenaica*) y cabras domésticas (*Capra hircus*), que pueden ser reflejo del esfuerzo que realiza el feto de una especie diferente a la de la madre para establecerse y sobrevivir en un medio hostil (Fernández Arias, 1999).

Es interesante resaltar que las gestaciones interespecies aquí planteadas, presentan características similares a ciertas patologías en gestaciones humanas, como la preeclampsia, la cual origina hipertensión materna, proteinuria, disfunción endotelial y alteraciones en los factores angiogénicos. McCarthy et al (2011) encontraron altas concentraciones del receptor sVEGF-R1 y menores concentraciones de VEGF y PlGF en mujeres con preeclampsia. Sin embargo, Rath y Tripathi (2012) encontraron mayores concentraciones séricas de VEGF en mujeres con este padecimiento, pero coinciden con lo anterior en cuanto a la sobreproducción de su receptor soluble. Alteraciones que podrían explicar los resultados obtenidos en las gestaciones híbridas del presente estudio, en donde una deficiente perfusión uterina, traerá consigo bajos niveles de oxígeno disponible, alterando así la producción de VEGF, VEGF-R1 y por lo tanto del sVEGF-R1. Al respecto Rajakumara et al (2004) demostraron que en gestaciones humanas afectadas por preeclampsia, la excesiva producción de factores inductores de hipoxia (HIFs), desequilibra la expresión de varios genes y afecta las funciones normales de la placenta. Además, altera la presencia y disponibilidad del VEGF y sus receptores VEGF-R1 y sVEGF-R1, éste último encargado de secuestrar a VEGF y de evitar por tanto su actividad biológica. Un mecanismo

como este podría también explicar que se detectara un aumento de las concentraciones de VEGF en las gestaciones híbridas, en comparación con las domésticas, ya que puede especularse que en las placentas de las gestaciones híbridas el desarrollo de un medio constantemente hipóxico, origine la liberación de mayores cantidades de HIFs y un consecuente incremento en la secreción de VEGF. Sin embargo, este factor no tendría la actividad biológica esperada, ya que podría encontrarse secuestrado por su receptor soluble.

Al respecto, Ahmed et al (2000) mencionan que durante los dos primeros tercios de la gestación en humanos, el VEGF y su receptor VEGF-R2, tienen una mayor expresión en los tejidos placentarios al iniciar la formación del lecho capilar y que esta expresión se ve disminuida en el último tercio. En cambio, en el último tercio de la gestación son el PIGF y el VEGF-R1, quienes favorecen el completo desarrollo de la placenta y potencializan el desarrollo y crecimiento del producto. Relacionado con lo anterior, Muetze et al (2010) mencionan que en humanos, durante un embarazo normal, la formación del lecho capilar en el último tercio de gestación, es sostenido y regulado por el PIGF. Sin embargo, cuando ocurre alguna patología durante el embarazo como en la preeclampsia, existe una alteración en la interacción de PIGF con su receptor VEGF-R1, lo que parece inducir al incompleto desarrollo del lecho vascular a lo largo de toda la gestación, ocasionando un ambiente placentario hipóxico constante, así como fetos que sufren restricción del crecimiento intrauterino.

En el presente trabajo, el PIGF-1 presentó menores concentraciones en las gestaciones híbridas en comparación con las domésticas, en especial en el último tercio de gestación, durante el cual deberían de haberse incrementado sus valores de la misma manera en que ocurrió en las gestaciones domésticas. Estos resultados similares a los obtenidos por Malamitsi-Puchner et al (2005) en humanos, donde mencionan que aquellas mujeres que presentaron durante su embarazo el síndrome de restricción del crecimiento intrauterino (IUGR),-(definido como la incapacidad fetal de alcanzar su potencial de crecimiento genéticamente determinado, en el útero)- (Muetze et al, 2010), tenían menores concentraciones de PIGF, en comparación con aquellas mujeres con embarazos normales. También mencionan que existe una asociación entre los bajos niveles de PIGF en la circulación materna, de mujeres que padecen preeclampsia y la presentación de placentas pequeñas con recién nacidos con bajo peso y tamaño al nacimiento.

Por tanto, tiene sentido que en el presente estudio, las gestaciones híbridas tuvieran un menor crecimiento placentario y fetal, cuyas consecuencias fueran un menor desarrollo de los cotiledones placentarios y el nacimiento de crías de menor peso y tamaño. Además es posible añadir que algunos autores mencionan que de encontrarse la expresión del gen del factor inductor de hipoxia 1A (HIF1A), inducida por la progesterona, las deficiencias en su secreción a lo largo de la gestación, pueden modificar la expresión de los HIFs y consecuentemente la expresión de VEGF en el endometrio materno y en el trofoectodermo del embrión (Bazer, 2008).

## **Duración de la gestación**

En el presente estudio se encontró que la duración de la gestación de borregas domésticas inseminadas con semen de borrego cimarrón fue mayor a la de borregas domésticas gestantes de borrego doméstico. La duración de la gestación es el periodo comprendido entre la fecundación y el parto. El genotipo fetal, es el factor más importante que determina la duración de la gestación y dentro de éste, el componente paterno parece ser más importante que el materno (Challis, 1998; Hafez, 2002; Neill, 2005). Debido a las diferencias genéticas se ha encontrado que los ovinos de razas de lana larga presentan gestaciones más largas que las ovejas de lana corta o de pelo. El inicio del parto depende de una señal iniciada por el embrión bajo el control de su propio genotipo, ya que al transferir un embrión de raza de lana larga y otro de raza de lana corta produce una gestación de duración similar a la de la raza del embrión que se caracterice por una menor. (Kitts et al. 1984 y 1985). En los bovinos, también la raza del embrión determina la duración de la gestación, lo que se ha demostrado mediante la transferencia de embriones de razas de gestación más corta a hembras de gestaciones más largas y viceversa (Kraemer 1983).

La influencia del genotipo fetal paterno se ha demostrado en híbridos entre caballo y burro, ya que la duración de la gestación es más parecida a la de las especies del padre que a la de la madre. Sin embargo, este parece no ser el caso en los ovinos, ya que en el presente trabajo la duración de las gestaciones híbridas solamente fue 6 días mayor que la de las gestaciones domésticas a pesar de

que en la especie utilizada como paterna en este estudio (borrego cimarrón) la duración de la gestación es de 175 a 179 días (Monson y Summer, 1990). Es decir, por lo menos 25 días más larga que en la oveja doméstica. Esto significa que en este caso la duración de la gestación fue más parecida a la de la especie materna que a la de la paterna.

### **Morfometría placentaria y de las crías.**

Se conoce que el tamaño de la placenta determina su capacidad para transferir nutrientes y que a su vez esta capacidad, tiene una alta correlación con la trayectoria del crecimiento fetal, prenatal fetal y con su peso al nacimiento. Es importante recordar que en el caso de los ovinos, el crecimiento placentario sucede principalmente durante los primeros dos tercios de gestación, alcanzando su máximo tamaño al día 90 de la preñez, mientras que el 90% del crecimiento fetal ocurre durante el último tercio de gestación, por lo que existe una correlación positiva entre el tamaño placentario y fetal (Redmer et al, 2004). Relacionando la información anterior con los resultados obtenidos en este estudio, el que en las gestaciones híbridas el área cotiledonaria sea significativamente menor en comparación a la de las gestaciones domésticas, permite inferir que se vio afectado el aporte de nutrientes y oxígeno de la madre hacia el producto, debido a un deficiente flujo sanguíneo, y por tanto es de esperar un reducido tamaño y peso de las crías híbridas al nacimiento ( Redmer et al, 2004).

Se sabe que a partir del primer tercio de gestación y conforme ésta avanza, van desarrollándose y creciendo los lechos vasculares de la placenta, gracias al proceso de angiogénesis (Redmer et al, 2004).

En el último tercio de la gestación el incremento del flujo sanguíneo uterino y umbilical, favorece una mayor tasa de crecimiento de la vascularización cotiledonaria en relación a la caruncular, lo que permite sostener el dramático crecimiento del feto en este último periodo (Redmer et al, 2004). Dado el menor crecimiento fetal durante las gestaciones híbridas es de suponerse que la causa principal de esto, sean alteraciones en la angiogénesis placentaria que deberán estudiarse con mayor detalle en trabajos posteriores.

El número de los cotiledones entre las placentas de las gestaciones híbridas y las domésticas no fue estadísticamente diferente. Sin embargo, debe tomarse en cuenta que la formación de cotiledones en las placentas de los rumiantes se lleva a cabo en el sitio en el que el útero materno tiene una carúncula, y que las carúnculas existen desde antes de la gestación (Noakes, 2001), por lo que no debe esperarse que su número no depende del tipo de gestación aunque existan diferencias endócrinas marcadas entre éstas. En cambio el área promedio sí fue significativamente menor ( $p < 0.01$ ) en las placentas de los híbridos (2.4 veces menor) respecto a las domésticas. A este respecto, Schmidt (2005), encontró en placentas de bovinos domésticos, búfalos acuáticos y búfalos africanos, que cuando el número de cotiledones es menor, los cotiledones desarrollan un mayor tamaño. Por el contrario, cuando existen más cotiledones el tamaño de cada uno de ellos se

reduce lo que puede considerarse como un mecanismo compensatorio de la placenta, que demuestra su gran plasticidad. De esta manera, si el útero de una hembra tiene un bajo número de carúnculas se promueve un mayor desarrollo de cada una de ellas. Sin embargo, las diferencias entre grupos con respecto al área de los cotiledones encontrada en el presente trabajo no se deben a un mecanismo compensatorio, ya que las placentas de las gestaciones domésticas (con mayor área cotiledonaria) no tenían menos cotiledones que los de las híbridas, por lo que más bien parecería que en las gestaciones híbridas existió una incapacidad para responder a condiciones de insuficiencia placentaria (cuya existencia es sugerida por el pobre desarrollo fetal), por lo que no desarrollaron un área cotiledonaria similar a la que se desarrolló en el mismo tipo de hembras cuando estaban gestantes con un embrión doméstico.

Es importante mencionar que las placentas de las gestaciones híbridas miden muy poco en comparación con las placentas de gestaciones domésticas. Lo que podría explicarse inicialmente por la alteración de los diversos factores angiogénicos placentarios (VEGF, PlGF-1, etc.), lo que podría ocasionar una insuficiencia placentaria, es decir; la reducción del flujo sanguíneo materno-fetal, junto con la formación de placentomas de menor tamaño. Insuficiencia asociada con el síndrome de restricción del crecimiento intrauterino (IUGR) en humanos, patología en la que se ve afectada la placenta y el feto, ya que las vellosidades placentarias se encuentran afectadas, ya que presentan áreas hipoperfundidas, que ocasionan una reducción en la transferencia de oxígeno y nutrientes hacia el feto, por lo tanto, éste se descompensa y no desarrolla un crecimiento óptimo (Morrison, 2008). Entonces es claro que al reducirse el tamaño de las áreas de

intercambio placentario, (placentomas) se afecta la capacidad de transporte de nutrientes de la madre al feto, impidiendo así el crecimiento exponencial que normalmente se presenta en el último tercio de la gestación (Morrison, 2008; Brunelli et al, 2010).

Por esta razón, algunos autores consideran que la obvia respuesta de adaptación fetal a un inadecuado desarrollo placentario, será el presentar un menor crecimiento (Ferrazi et al, 2011).

## **IX. CONCLUSIÓN**

El presente trabajo demostró que una gestación interespecie (*Ovis aries* x *Ovis canadensis*) posee características específicas; como son las diferentes concentraciones de progesterona, el VEGF y el PIGF-1. Tomando en cuenta el papel que desempeña cada uno de estos factores a lo largo de la gestación, así como también las concentraciones obtenidas en gestaciones domésticas, es posible asociar los niveles obtenidos de cada uno de estos factores con las medidas morfométricas placentarias, cotiledonarias y de las crías obtenidas, las cuales se encontraron disminuidas en comparación con aquellas medidas obtenidas en una gestación doméstica.

La información generada puede contribuir al estudio de gestaciones interespecíficas, modelo comúnmente requerido para la conservación *ex situ* de fauna silvestre amenazada o en peligro de extinción. Además, podría aportar información relevante sobre gestaciones comprometidas y con crecimiento fetal intrauterino

restringido, no únicamente en animales domésticos sino también en fauna silvestre, ya que contempla la generación y estudio de gestaciones entre ovinos domésticos y silvestres.

El presente trabajo permite plantear a futuro la evaluación de tratamientos para incrementar el tamaño placentario y en consecuencia el tamaño fetal durante una gestación restringida. Por lo tanto, podría contribuir a la solución de un problema importante en la salud y el bienestar animal.

## X. LITERATURA

1. Ahmed A., Dunk C., Ahmad S. y Khaliq A. Regulation of placental vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PIGF) and soluble flt-1 by oxygen (A Review). *Placenta* 2000; 21(14): s16-s24
2. Allen W.R., Skidmore J.A, Stewart F. and Antczak D.F. Effects of fetal genotype and uterine environment on placental development in equids. *Journal of Reproduction and Fertility* 1993; 97: 55-60
3. Allen W.R., Carter A.M., Chavatte-Palmer P., Dantzer V., Enders A.C., Freyer C., Leiser R. and Miglino M.A. Comparative placentation. *Placenta* 2003;24(17): s100-s103
4. Álvarez-Romero J. y Medellín RA. *Ovis canadensis*. Vertebrados superiores exóticos en México: diversidad, distribución y efectos potenciales. Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto U020. México. D.F, 2005
5. Amstislavsky S, Aalto J, Jaärvinen M, Lindeberg H, Valtonen M, Zudova G, Ternovskaya Y. Transfer of european mink (*Mustela lutreola*) embryos into hybrid recipients. *Theriogenology* 62 (2004) 458–467

6. Autiero M, Luttun A, Tjwa M, Carmelie P. Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders (A review). *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2003; 1: 1356–1370
7. Ayad A, Sousa MN, Sulon J, Hornick JL, Watts J, Lopez-Gatius F, Iguer-Ouada M, Beckers JF. Influence of progesterone concentrations on secretory functions of trophoblast and pituitary during the first trimester of pregnancy in dairy cattle. *Theriogenology* 2007; 67: 1503–1511
8. Bazer FW, Burghardt RC, Johnson GA, Spencer TE, Wu G. Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell signaling pathways. *Reproductive Biology* 2008; 8 (3): 179-203.
9. Bennet S, Foster W. Successful transfer of zebra embryo to a domestic horse. *Equine Vet J. Suppl* 1985; 3: 78-79.
10. Berisha B, Schams D, Kosmann M, Amselgruber W and Einspanier R. Expression and localization of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. *Journal of Endocrinology* 2000; 167: 371-382
11. Black SG, Arnau F, Palmarini M, Spencer TE. Endogenous retroviruses in trophoblast differentiation and placental development. *American Journal of Reproductive Immunology* 2010; 64: 255–264
12. Blanca-Mena MJ. Alternativas de análisis estadístico en los diseños de medidas repetidas. *Psicothema* 2004; 16(3): 509-518
13. Boeta M., Zarco L. Endocrine alterations around the time of abortion in mares impregnated with donkey or horse semen. *Animal Reproduction Science* 2010; 121: 124–130

14. Boeta, M., Zarco, L. Luteogenic and luteotropic effects during pregnancy in the mare. *Animal Reproduction Science* 2012; 130:57-62
15. Bogic LV, Brace RA, Cheung C.Y. Cellular localization of vascular endothelial growth factor in ovine placenta and fetal membranes. *Placenta* 2000; 21: 203-209
16. Bogic LV, Brace RA, Cheung CY. Developmental expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors and VEGF Binding in ovine placenta and fetal Membranes. *Placenta* 2001; 22: 265-275
17. Borowicz P, Arnold R, Johnson L, Grazul-Bilska T, Redmer A, Reynolds P. Placental growth throughout the last two thirds of pregnancy in sheep: vascular development and angiogenic factor expression. *Biol Reprod* 2007; 76: 259-267.
18. Boskovic A, Bender A, Gall L, Ziegler-Birling C, Beaujean N and Torres-Padilla M. Analysis of active chromatin modifications in early mammalian embryos reveals uncoupling of H2A.Z acetylation and H3K36 trimethylation from embryonic genome activation. *Epigenetics* 2012 ; 7:7, 747-757
19. Brunelli R, Masselli G, Parasassi T, De Spirito M, , Parasassi T, Papi M, Perrone G, Pittaluga E, Gualdi G, Pollettini E, Pittalis A, Anceschi M. Intervillous circulation in intra-uterine growth restriction. correlation to fetal well being. *Placenta* 2010; 31:1051-1056.
20. Bunch TD, Cox LM. Argali-mouflons- gambling with genes. *Wild Sheep Int.* 1980; 2: 9-12.
21. Bunch TD, Workman GW. Hybridization of desert bighorn and argali-mouflon wild sheep. *Desert Bighorn Counc. Trans.* 1988; 32: 16-18.
22. Calderón RB. Estudio de la gestación de borregas domésticas inseminadas con borrego cimarrón y doméstico, mediante concentraciones de progesterona, morfometría e histología placentaria (Tesis maestría). México, D.F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM, 2009.

23. Carlson B. EMBRIOLOGÍA BÁSICA DE PATTEN. Mc Graw Hill Interamericana, 1990
24. Challis RGJ. The placenta clock. Trofoblast Research 1998;12: 361-374
25. Challis J., Sloboda D., Matthews S., Holloway A., Alfaidy N., Howe D., Fraser M. and Newnham J. Fetal hypothalamic-pituitary adrenal (hpa) development and activation as a determinant of the timing of birth, and of postnatal disease. Endocrine Research 2000; 26 (4): 489-504
26. Cheung CY, Brace RA. Ovine vascular endothelial growth factor: nucleotide sequence and expression in fetal tissues. Growth Factors 1998; 16: 11-22.
27. Cheung CY, Singh M, Ebaugh MJ, Brace RA. Vascular endothelial growth factor gene expression in ovine placenta and fetal membranes. Am J Obstet Gynecol 1995; 173 (3 pt 1)
28. Cognie Y. State of the art in sheep-goat embryo transfer. Theriogenology 1999; 51: 105-116.
29. Coonrod SA, Flores-Foxworth G, Moreno JF, Westhusin M, Byrd SR, Kraemer D. Birth of armenian red sheep (*Ovis orientalis*) lambs to domestic sheep (*Ovis aries*) following interspecific embryo transfer of IVM-IVF derived embryos. Theriogenology 1994; 41: 182.
30. Crosby TF, O'Donnell A, O'Doherty JV, Quinn PJ, Evans ACO. Effects of exogenous progesterone on gestation length, foetal survival and colostrum yield in ewes. Theriogenology 2005; 64: 1121–1129
31. De Falco S. The discovery of placenta growth factor and its biological activity. Experimental and molecular medicine 2012; 44(1): 1-9
32. Delgadillo A, Mejía O, Berruecos J, Vàsquez C. Estudio morfológico de los cromosomas del borrego Cimarrón (*Ovis canadensis*), Tabasco o Pelibuey (*Ovis aries*) y su cruce. Veterinaria México 2003; 34: 27-37.

33. Duranthon V, Watson AJ, Lonergan P. Focus on mammalian embryogenomics preimplantation embryo programming: transcription, epigenetics, and culture environment. *Reproduction* 2008; 135: 141-150
34. Ducoing Watty AM. *Introducción a la Estadística*. Publicaciones FMVZ UNAM, 2009
35. Dyce KM, Wensing GCJ, Sack WO. *ANATOMÍA VETERINARIA*. 2daEd. Mac Graw Hill Interamericana, 1999
36. Ebos ML, Bocci G, Man S, Thorpe PE, Hicklin DJ, Zhou D, Jia X, Kerbel R. A naturally occurring soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 2 detected in mouse and human plasma. *Molecular Cancer Research* 2004;2(6):315 – 326
37. Errico M, Riccioni T, Lyer S, Pisano C, Acharya K. R, Persico M.G, De Falco S. Identification of placenta growth factor determinants for binding and activation of Flt-1 receptor. *The journal of biological chemistry* 2004;279(42); 43929–43939
38. Fang X, Wong S, Mitchell BF. Effects of RU486 on estrogen, progesterone, oxytocin, and their receptors in the rat uterus during late gestation. *Endocrinology* 1997; 138 (7)
39. Fernández Arias A, Alabart J, Folch J, Beckers J. Interspecies pregnancy of spanish ibex (*Capra pyrenaica*) in domestic goat (*Capra hircus*) recipients induces abnormally high plasmatic levels of pregnancy - associated glycoprotein. *Theriogenology* 1999; 51: 1419-1430.
40. Fernández-Arias A, Roche A, Alberio R, Alabart J, Folch J. Use of hybrids as recipients in interespecies embryo transfer in the capra genus. *Proceedings of the Annual Conference. International Embryo Transfer Society. Theriogenology* 2001; 55: 383
41. Ferrara N and Davis-Smyth T. The biology of Vascular Endothelial Growth Factor. *Endocrine Reviews* 1997; 18: 4-25
42. Ferrara N, Frantz G, Lecouter J, Dillard-Telm L, Pham T, Draksharapu A, Giordano T, Peale F. Differential expression

- of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries. *American J of Pathology* 2003; 162
43. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine Reviews* 2004; 25(4):581-611.
  44. Ferrazzi E, Rigano S, Padoan A, Boito S, Pennati G, Galan HL. Uterine artery blood flow volume in pregnant women with an abnormal pulsatility index of the uterine arteries delivering normal or intrauterine growth restricted newborns. *Placenta* 2011; 32: 487-492
  45. Garde J, Perez S, Aguado M, Ayllon E, Garrido D, Montoro V. Live birth of hybrid (*O. musimon* x *O. aries*) lambs following intrauterine insemination in domestic sheep with mouflon semen obtained 40 hours postmortem. *Theriogenology* 1995; 43: 218.
  46. Girling JE, Lederman FL, Walter LM, Rogers PA. Progesterone, but not estrogen, stimulates vessel maturation in the mouse endometrium. *Endocrinology* 2007; 148(11):5433–5441
  47. Gootwine E. Placental hormones and fetal–placental development. *Animal Reproduction Science* 2004; 82–83 :551–566
  48. Hafez ESE, Hafez B. *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. 7maEd. Interamericana, Mcgraw-hill: 2002
  49. Hansen PJ. Regulation of uterine immune function by progesterone lessons from the sheep. *J Reprod Immun* 1998; 40:63-79
  50. Hastings JM, Licence DR, Burton G J, Charnock-Jones SD, Smith SK. Soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 inhibits edema and epithelial proliferation induced by 17 $\beta$ -estradiol in the mouse uterus. *Endocrinology* 2003; 144 (1): 326–334
  51. Hoffman R.S., Woolf A. G-band patterns as chromosomal

- markers, and the interpretation of chromosomal evolution in wild sheep (*Ovis aries*). *Experientia* 1973; 29: 117-119.
52. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Molecular Endocrinology* 1991; 5(12): 1806-14
  53. Igwebuike UM. Trophoblast cells of ruminant placentas (a minireview). *Animal Reproduction Science* 2006; 93: 185–198.
  54. Jainudeen MR y Hafez ESE. Genética de la incapacidad reproductiva. *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. E.S.E Hafez y B. Hafez. 7ma.Ed. Interamericana, McGraw-hill: 2002 : pp.323
  55. Kaczmarek MM, Kiewisz J, Schams D, Ziecik AJ. Expression of VEGF-receptor system in conceptus during peri-implantation period and endometrial and luteal expression of soluble VEGFR-1 in the pig. *Theriogenology* 2009; 71: 1298–1306
  56. Killen ID, Caffery GJ. Uterine insemination of ewes with the aid of a laparoscope. *Australian Veterinary Journal* 1982; 59(3): 95
  57. Kitts DD, Anderson GB, Stabenfeldt GH. The influence of fetal genome on cortisol biokinetics and gestational duration. *Growth* 1984; 48(2):198-208
  58. Kitts DD, Anderson GB, Bon Durant RH, Kindahl H. and Stabenfeldt H. Studies on the endocrinology of parturition: relative steroidogenesis in coexisting genetically dissimilar ovine fetuses, concomitant with the temporal patterns of maternal c<sub>18</sub> and c<sub>19</sub> steroids and prostaglandin f<sub>2α</sub> release. *Biology of Reproduction* 1985; 33: 67-78
  59. Kraemer D.C. Intra and interspecific embryo transfer. *Journal of Experimental Zoology* 1983; 228(2): 363–371
  60. Krauss T, Pauer HU, Augustin HG. prospective analysis of placenta growth factor (plgf). concentrations in the plasma of

- women with normal pregnancy and pregnancies complicated by preeclampsia. *Hypertension in pregnancy* 2004; 23(1):101-111
61. Lasley B., Loskutoff N., Anderson G. The limitation of conventional breeding programs and the need and promise of assisted reproduction in non-domestic species. *Theriogenology* 1994; 41: 119-132.
  62. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV and Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1992; 246: 1306-1309
  63. Madan M.L., Singla S.K., Chauhan and Manik R.S. In vitro production and transfer of embryos in buffalo. *Theriogenology* 1994; 41:139-143
  64. Malamitsi-Puchner A, Boutsikou T, Economou E, Sarandakou A, Makrakis E, Hassiakos D and George C. Vascular Endothelial Growth Factor and Placenta Growth Factor in Intrauterine Growth-Restricted Fetuses and Neonates. *Mediators of Inflammation* 2005;5: 293-297
  65. Manalu W, Sumaryadi MY. Maternal serum progesterone concentration during pregnancy and lamb birth weight at parturition in Javanese Thin-Tail ewes with different litter sizes. *Small Ruminant Research* 1998; 30: 163-169
  66. Mark PJ, Smith JT and Waddell BJ. Placental and Fetal Growth Retardation Following Partial Progesterone Withdrawal in Rat Pregnancy. *Placenta* 2006; 27: 208-214
  67. Martínez AG. Optimización de métodos de criopreservación de embriones bovinos y ovinos (Tesis Doctorado). Argentina, Buenos Aires: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 2006.
  68. Martínez-Rojero RD. Comparación de cinco técnicas de campo para detectar preñez en ovejas pelibuey. *Veterinaria México* 1999; 30(002): 193-198
  69. Maxwell W.M.C. Artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen at a synchronised oestrus. 2. Effect of dose of

- spermatozoa and site of intrauterine insemination on fertility. *Animal Reproduction Science* 1986; 10(4): 309–316
70. McCarthy FP, Kingdom JC, Kenny LC, Walsh SK. Animal models of preeclampsia; uses and limitations. *Placenta* 2011; 32: 413-419.
71. Mckinnon A.O., Tinson A.H. and National G. Embryo transfer in dromedary camels. *Theriogenology* 1994; 41:145-150
72. Mejía VO, Cervantes MJ, Peña RM, Palma IM, Cinco FF, Gurrola DI. Características reproductivas en híbridos de cimarrón (*Ovis canadensis mexicana* x *Ovis aries*). Memorias del II Congreso Latinoamericano de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos. XI Congreso Nacional de Producción Ovina. Yucatán, México. 2001; 5 pp.
73. Mejía VO, Gual Sill F, Núñez Saavedra J, Pérez Medina M, Palma Irizarry M. Esquemas de sincronización y superovulación en ovejas domésticas (*Ovis aries*) como modelo para la transferencia de embriones en Borrego Cimarrón (*Ovis canadensis*). Memorias del XIX Congreso Nacional de Zoología. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, 2008.
74. Mejía VO., Murcia MC, Soto MS, Moreno LA, Artee FJ. Híbridos entre borregos cimarrón y domésticos como modelo de gestación inter-especies(*Ovis canadensis* x *Ovis aries*). Memorias del XXXV Congreso Nacional de Buiatría. León, Gto. 2011
75. Méndez HJ. Expresión de VEGF y sus receptors en Folículos dominantes del estro y Folículos sanos y atrésicos del día seis del ciclo estral (Tesis Maestría). México DF, México: FMVZ UNAM, 2010.
76. Monson G, editor y Sumner L, editor. *The Desert Bighorn: Its Life History, Ecology and Management*. The University of Arizona Press, Tucson, Arizona: 1980
77. Morrison JL. Sheep models of intrauterine growth restriction: fetal adaptations and consequences (Brief Review). *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2008; 35:

730–743.

78. Muetze S, Kapagerof A, Vlachopoulos L, Eggermann T, Zerres K, Rath W, Rudnik-Schoeneborn S. Mutation analysis of the growth factor genes PIGF, Flt1, IGF-I, and IGF-IR in intrauterine growth restriction with abnormal placental blood flow. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, February 2010; 23(2): 142–147
79. Neill JD, editor. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 3rded. Elsevier: 2005
80. Noakes David E, Arthur Geoffrey H, Parkinson Timothy J, England Gary C. W. *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*, 8thed.Saunders: 2001
81. Noden DM. y De Lahunta A. *Embriología de los Animales Domésticos*. 1aed.Acribia: 1990
82. Park JE, Chen HH, Winer J, Houcks KA, Ferrara N. Placenta growth factor potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to flt-1 but not to flk-1/kdr. *The Journal of Biological Chemistry* 1994; 269: 41; 25646-25654
83. Parraguez VH, Atlagich M, Díaz R, Cepeda R, González C, De los reyes M, Bruzzone ME, Behn C, Raggi LA. Ovine placenta at high altitudes: comparison of animals with different times of adaptation to hypoxic environment. *Animal Reproduction Science* 2006; 95: 151-157.
84. Penningaa L, Longob LD. Ovine placentome morphology: effect of high altitude, long-term hypoxia. *Placenta* 1998; 19: 187- 193.
85. Pineda M, editor y Dooley MP, editor. *McDonald's Veterinary Endocrinology and Reproduction*. 5th Ed. USA: 2002
86. Porrás-Almeraya A, Zarco-Quintero LA, Valencia-Méndez J. Estacionalidad reproductiva en ovejas. *Ciencia Veterinaria* 2003; 9(4)
87. Power GAS, Patrick JE, Carson GD, Challis JRG. The fetal membranes as possible source of progesterone in the

- amniotic and allantoic fluids of pregnant sheep. *Endocrinology* 1982; 110(2)
88. Quintela LA, Díaz C, Peña AI, Becerra J, Herradón PG. Diagnóstico precoz de gestación por ecografía transrectal en la oveja. *Archivos de zootecnia* 1999; 48(181): 14
  89. Rajakumar A, Brandon HM, Daftary A, Ness R, Conrad KP. Evidence for the functional activity of hypoxia-inducible transcription factors overexpressed in preeclamptic placentae. *Placenta* 2004; 25: 763 to 769
  90. Ranilla MJ, Sulon J, Carro MD, Mantecon AR, Becker JF. Plasmatic profiles of pregnancy-associated glycoprotein and progesterone levels during gestation in churra and merino sheep. *Theriogenology* 1994; 42: 537-545
  91. Rath G y Tripathi R. VEGF and its soluble receptor VEGFR-2 in hypertensive disorders during pregnancy: the Indian scenario. *Journal of Human Hypertension* 2012;26(3):196-204
  92. Razdan P, Tummaruk P, Kindahl H, Rodriguez-Martinez H, Hulte'n F and Einarsson F. The impact of induced stress during Days 13 and 14 of pregnancy on the composition of allantoic fluid and conceptus development in sows. *Theriogenology* 2004; 61: 757–767
  93. Redmer DA, Wallace JM, Reynolds LP. Effect of nutrient intake during pregnancy on fetal and placental growth and vascular development. *Domestic Animal Endocrinology* 2004; 27: 199-217.
  94. Regnault TRH, Orbus RJ, Vrijer de B, Davidsen ML, Galan HL, Wilkening RB, Anthony RV. Placental expression of VEGF, PIGF and their receptors in a model of placental insufficiency-intrauterine growth restriction (PI-IUGR). *Placenta* 2002; 23: 132-144.
  95. Reynolds LP, Borowicz PP, Vonnahme KA, Johnson ML, Grazul-Bilska AT, Wallace JM, Caton JS, Redmer DA. Animal models of placental angiogenesis. *Placenta* 2005; 26: 689-708.

96. Romualdo J, Sierra A, Ortíz J, Hernández J. Caracterización morfológica del ovino pelibuey local en Yucatán, México. *Archivos Latinoamericanos de Producción animal* 2004; 12 (4 pte 1):126-31
97. Rosa HJD y Bryant MJ. Seasonality of reproduction in sheep (Review). *Small Ruminant Research* 2003; 48: 155–171
98. Rosales-Torres AM, Alonso I, Vergara M, Romano MC, Castillo-Juárez H, Ávalos A, Rosado A, Gutiérrez CG. Vascular endothelial growth factor isoforms 120, 164 and 205 are reduced with atresia in ovarian follicles of sheep. *Animal Reproduction Science* 2010; 122: 111–117
99. Rosales-Torres AM, Guzmán Sanchez A. Importancia del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) y de sus receptores en el ciclo ovárico (Revisión). *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 2011; 3(1): 89-111
100. Sammin D, Markey B, Bassett H, Buxton D. The ovine placenta and placentitis. A review. *Veterinary Microbiology* 2009; 135: 90–97
101. Santiago-Moreno J., Toledano-Díaz A., Pulido-Pastor A., Gómez-Brunet A., López-Sebastián A. Birth of live spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*) derived from artificial insemination with epididymal spermatozoa retrieved after death. *Theriogenology* 2006;66, 283–291.
102. Schmidt S. Morphology of peri-partal placentomes and post-partal foetal membranes in african buffalo (*Syncerus caffer*) and comparative aspects with cattle (*Bos Taurus*)(Tesis de Maestría). South Africa, University of Pretoria: 2005
103. Serrano-García MA. Papel de la placenta en el desarrollo fetal y en la salud del adulto. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia. Desarrollo perinatal: origen de patologías adultas. Monografía XXII, 2008
104. Shibata E, Rajakumar A, Powers WR, Larkin RW, Gilmour C, Bodnar LM, Crombleholme WR, Ness RB, Roberts JM, Hubel CA. Soluble fms-like tyrosine kinase 1 is increased in preeclampsia but not in normotensive pregnancies with small-

- for-gestational-age neonates: relationship to circulating placental growth factor. *Clinical Endocrinology & Metabolism* 2005; 90(8):4895
- 105.** Song W, Jinyoung K, Fuller W, Bazer and Spencer TE. Progesterone and interferon tau regulate hypoxia-inducible factors in the endometrium of the ovine uterus. *Endocrinology* 2008; 149(4):1926–1934.
- 106.** Soto S. Monitoreo no invasivo de las etapas reproductivas en borregas cimarrón (*Ovis canadensis mexicana*) en cautiverio mediante la observación conductual reproductiva y la cuantificación de esteroides fecales (Tesis Maestría). México DF, México: FMVZ-UNAM, 2006.
- 107.** Spencer TE, Bazer FW. Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. *Frontiers in Bioscience* 2002; 7: 1879 - 1898.
- 108.** Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC. Fetal-maternal interactions during the establishment of pregnancy in ruminants. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 2007; 64:379-96
- 109.** Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Bazer FW. Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from Domestic Animals. *Biology of Reproduction* 2004; 71: 2–10
- 110.** Vonnahme KA, Wilson ME, Li Y, Rupnow HL, Phernetton TM, Ford SP, Magness RR. Circulating levels of nitric oxide and vascular endothelial growth factor throughout ovine pregnancy. *J Physiol* 2005
- 111.** Wooding FBP, Burton GJ. Comparative placentation structures, functions and evolution. United of Kingdom, Cambridge. Springer: 2008
- 112.** Wulff C, Wilson H, Dickson S, Wiegand SJ, Frases H. Hemochorial placentation in the primate: expression of vascular endothelial growth factor, angiopoietins and their receptors throughout pregnancy. *Biology of reproduction* 2002; 66: 802-812.

- 113.** Yamakawa M, Liu LX, Date T, Belanger AJ, Vincent KA, Akita GY, Kuriyama T, Cheng SH, Gregory RJ, Jiang C. Hypoxia-inducible factor-1 mediates activation of cultured vascular endothelial cells by inducing multiple angiogenic factors. *Circulation Research* 2003; 93:664-73
- 114.** Yang W, Ahn H, Hinrichs M, Torry RJ, Torry DS. Evidence of a novel isoform of placenta growth factor (PlGF-4) expressed in human trophoblast and endothelial cells. *J Reprod Immunol* 2003; 60:53-60
- 115.** Yotov S. Diagnostics of early pregnancy in stara zagora dairy sheep breed. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 2005; 8(1): 41-45