



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

**EMPLEO DE PROGESTERONA (P4) Y TADALAFIL (CIALIS), PARA
FAVORECER EL DESARROLLO PLACENTARIO Y EL CRECIMIENTO
FETAL EN GESTACIONES RESTRINGIDAS.**

TESIS

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

PRESENTA:

GABRIEL TRUJANO TORRES

TUTOR PRINCIPAL: VICENTE OCTAVIO MEJÍA VILLANUEVA (FMVZ-UNAM)

COMITÉ TUTORAL: FERNANDO BORDERAS TORDESILLAS (UAM-X)

LUIS ALBERTO ZARCO QUINTERO (FMVZ-UNAM)

MÉXICO D.F. Enero 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



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. A quienes la ilusión de su vida ha sido convertirme en persona de provecho. A quienes nunca podre pagar todos sus desvelos ni aun con las riquezas más grandes del mundo. Porque gracias a su apoyo y consejo, he llegado a realizar la más grande de mis metas. La cual constituye la herencia más valiosa que pudiera recibir. Deseo de todo corazón que mi triunfo profesional lo sientan como suyo. Con Amor, Admiración y Respeto.

A mis hermanos Maura y Gustavo, por su solidaridad, apoyo y confianza. A mi prima Roció Dolores Torres López, que más que una prima, siempre la he visto como la hermana mayor, a la cual admiro y quiero mucho.

A todos los amigos y amigas que conocí durante estos años, en especial, al equipo extensionista, el cual se compone, de gente maravillosa como Patricia Navarro, Alberto Rodríguez, Nina López, Juan Flores, Daniel Tovar y Laura Desiderio.

A la mejor extensionista Esther Miguel, la cual me ha enseñado a ser una mejor persona y con la cual empezamos a una maravillosa historia juntos. Te Amo

También me encontré a mis amigos y conocí nuevas personas, las cuales me ayudaron a realizar este proyecto de Tesis, a la MVZ. Erika de la Cruz, MVZ. Mónica Buis, MVZ. Angélica Gabriela Jacobo, al MVZ. Rubén Félix, MVZ. Francisco Serrano, Yoalli Suarez, Muchas Gracias por su total apoyo y consejos.

A todos los Doctores y Trabajadores de CEIEPO, gracias por su apoyo y consejos.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Octavio Mejía por darme la oportunidad de poder trabajar con el, por darme consejos, brindarme sus enseñanzas y su amistad. Porque sin su apoyo no hubiera podido cumplir esta meta. Muchas Gracias

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

Al Doctor Fernando Borderas, por brindarme su amistad y transmitirme sus conocimientos, para poder realizar esta Tesis.

A la MVZ. Clara Murcia Mejía por su contribución para realizar el procesamiento de las muestras en el Laboratorio de Endocrinología del Departamento de Reproducción Animal en la FMVZ-UNAM.

A la MC. Ana Delia Rodríguez por su trabajo, en 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 en la FMVZ-UNAM. Además de ser una excelente persona, una gran profesional y contar con su Amistad.

Al MC. Noé Orlando Juárez por su colaboración en el análisis e interpretación de los resultados, además de ser una gran profesional y por brindarme su amistad.

AL PROGRAMA DE APOYO A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN TECNOLÓGICA (PAPIIT). POR EL FINANCIAMIENTO OTORGADO AL PROYECTO IT201512 “PROMOCIÓN DE LA VASCULARIZACIÓN PLACENTARIA Y DEL CRECIMIENTO FETAL INTRAUTERINO EN GESTACIONES RESTRINGIDAS”.

AI CONACYT. POR LA BECA OTORGADA DURANTE MIS ESTUDIOS DE MAESTRÍA.

INDICE

RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	10
I. INTRODUCCIÓN.....	12
II. REVISION DE LITERATURA.....	15
Generalidades Reproductivas del Ovino Doméstico y el Borrego Cimarrón.....	15
Ciclo Estral.....	15
Fase Folicular.....	16
Fase Lútea.....	17
Pre- implantación.....	18
Implantación.....	20
Membranas Placentarias.....	21
Placenta.....	23
Clasificación de las Placentas.....	24
Angiogénesis Placentaria.....	28
Moléculas involucradas en la Gestación.....	32
Progesterona (P4).....	32
Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF).....	35
Factor de Crecimiento Placentario (PIGF-1).....	39
Relaciones entre los factores de crecimiento placentarios y sus receptores.....	42
Receptores Solubles.....	45
Relación de la hipoxia con algunos factores de crecimiento vasculares endoteliales.....	46
Modo de acción de algunos vasodilatadores desarrollados para tratar la disfunción eréctil	49
Tadalafil y Sildenafil.....	49
Fosfodiesterasa (PDE).....	52
Oxido Nítrico (ON).....	54
Algunos Antecedentes de Gestaciones Interespecies.....	57
III. JUSTIFICACIÓN.....	59
IV. HIPOTESIS.....	60
V. OBJETIVO.....	60
Objetivo general.....	60

Objetivos específicos.....	60
VI. MATERIAL Y METODOS.....	61
Localización.....	61
Animales.....	61
Producción de Embriones.....	62
Recolección de Embriones.....	63
Transferencia de Embriones Híbridos de Cimarrón a Receptoras Domésticas.....	65
Diagnóstico de Gestación.....	66
Tratamiento con Progesterona (P4) y Tadalafil (<i>Cialis</i>) para favorecer el crecimiento placentario y fetal.....	67
Muestras Sanguíneas.....	68
Determinación de las concentraciones séricas de P4, VEGF Y PLGF.....	68
<i>Radioinmunoensayo</i>	68
<i>Enzimo-inmunoanálisis (ELISA)</i>	69
Morfometría de las placentas.....	69
Análisis Estadístico.....	71
VII. RESULTADOS.....	73
Efecto del grupo y tratamiento sobre las concentraciones séricas de Progesterona (P4) a lo largo de la gestación.	73
Efecto del grupo y tratamiento sobre las concentraciones séricas de VEGF a lo largo de la gestación.....	77
Efecto del grupo y tratamiento sobre las concentraciones séricas de PIGF-1 a lo largo de la gestación	77
Efecto del grupo y tratamiento sobre el tiempo de gestación, peso al nacimiento y las características de la placenta y los cotiledones.....	84
VIII. DISCUSIÓN.....	88
IX. CONCLUSIONES.....	101
X. LITERATURA CONSULTADA.....	102

Cuadros, Gráficas y Figuras

Figura 1. Inseminación artificial empleando semen congelado de borrego cimarrón.....	63
Cuadro 1. Clasificación de los embriones por grado de desarrollo.....	64
Cuadro 2. Clasificación de los embriones por calidad.....	64
Figura 2. Recolección de embriones por laparotomía medio ventral.....	66
Figura 3. Diagnóstico de gestación por ultrasonografía.....	67
Figura 4. Recuperación de la placenta después del parto.....	70
Figura 5. Placenta dividida en cuatro cuadrantes, para la obtención de cotiledones.....	70
Figura 6. Medición de los cotiledones de cada uno de los diferentes cuadrantes.....	70
Figura 7. Peso de los cotiledones.....	71
Gráfica 1. Concentraciones semanales de P4 en suero en gestaciones con embrión doméstico sin tratamiento (n=5) o con embrión híbrido sin tratamiento n=4.....	74
Gráfica 2. Concentraciones semanales de P4 en suero en gestaciones con embrión híbrido sin tratamiento (n=4) o con embrión híbrido y tratamiento con P4 (n=4)	74
Gráfica 3. Concentraciones semanales de P4 en suero en gestaciones con embrión híbrido sin tratamiento (n=4) o con embrión híbrido y tratamiento con progesterona y Tadalafil (n=5).....	75
Gráfica 4. Concentraciones semanales de P4 en suero en gestaciones con embrión híbrido sin tratamiento (n=4) o con embrión híbrido y tratamiento con Tadalafil (n=5).....	75
Gráfica 5. Diagramas de barras de la concentración de progesterona por tercio de gestación de acuerdo al tipo de grupo.....	76
Gráfica 6. Perfil semanal de la concentración de VEGF en suero pg/m entre, Embrión Doméstico Sin Tratamiento n=5; Embrión Híbrido Sin Tratamiento n=4....	77
Gráfica 7. Perfil semanal de la concentración de VEGF pg/ml entre, Embrión Híbrido Sin Tratamiento n=4; Embrión Híbrido + P4 n=4.	78
Gráfica 8. Perfil semanal de la concentración de VEGF en suero pg/ml entre, Embrión Híbrido Sin Tratamiento n=4; Embrión Híbrido +P4+Tadalafil	78

n=5.....	
Gráfica 9. Perfil semanal de la concentración de VEGF en suero pg/ml entre, Embrión Híbrido Sin Tratamiento n=4; Embrión Híbrido + Tadalafil n=5.....	79
Gráfica10. Diagramas de barras de la concentración de VEGF por tercio de gestación de acuerdo al tipo de grupo	80
Gráfica 11. Perfil semanal de la concentración de PIGF-1 en suero pg/ml entre, Embrión Doméstico Sin Tratamiento n=5.....	81
Gráfica 12. Perfil semanal de la concentración de PIGF-1 pg/ml entre, Embrión Híbrido Sin Tratamiento n=4; Embrión Híbrido + P4 n=4.....	82
Gráfico 13. Perfil semanal de la concentración de PIGF-1 en suero pg/ml entre, Embrión Híbrido Sin Tratamiento n=4; Embrión Híbrido +P4+Tadalafil n=5.....	82
Gráfico 14. Perfil semanal de la concentración de PIGF-1 en suero pg/ml entre, Embrión Híbrido Sin Tratamiento n=4; Embrión Híbrido + Tadalafil n=5.....	83
Gráfico 15. Diagramas de barras de la concentración de PIGF-1 por tercio de gestación de acuerdo al tipo de grupo.....	84
Cuadro 3. Duración de la gestación (días) de acuerdo al tipo de gestación y tratamiento recibido.....	84
Cuadro 4. Peso (kg) de los corderos al nacimiento de acuerdo al tratamiento y tipo de gestación.....	85
Cuadro 5. Longitud de la placenta (cm) de acuerdo al tratamiento y tipo de gestación.....	85
Cuadro 6. Ancho de la placenta (cm) de acuerdo al tratamiento y tipo de gestación.....	86
Cuadro 7. Número de cotiledones de acuerdo al tratamiento y tipo de gestación.....	86
Cuadro 8. Área de cotiledones (mm ²) de acuerdo al tratamiento y tipo de gestación.....	87
Cuadro 9. Peso de los cotiledones de acuerdo al tratamiento y tipo de gestación...	87

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó si la administración exógena de Progesterona y Tadalafil favorece el desarrollo placentario y el crecimiento intrauterino fetal en las gestaciones híbridas entre borregos Cimarrón y ovejas domésticas (*Ovis canadensis* x *O. aries*). Para ello, se transfirieron embriones híbridos (*O. canadensis* x *O. aries*) a receptoras domésticas (*O. aries*) y al diagnosticarlas como gestantes fueron divididas en 5 grupos: grupo 1 (n=5, embrión doméstico sin tratamiento), grupo 2 (n= 4, embrión híbrido sin tratamiento), grupo 3 (n=4, embrión híbrido + P4), grupo 4 (n=4, embrión híbrido + P4 + Tadalafil) y grupo 5 (n=5 embrión híbrido + Tadalafil). Al parto se determinó la duración de la gestación, el peso de los corderos, el largo y ancho de la placenta, así como el número, área y peso de los cotiledones. Se presentaron las menores concentraciones de P4 en el grupo 2 a lo largo de la gestación, y en el caso de PIGF-1 se obtuvieron las mayores concentraciones en el grupo 2 en el segundo y tercer tercio de la misma. De VEGF se obtuvieron las mayores concentraciones durante el segundo y tercer tercios de todos los grupos con gestaciones híbridas. La duración de la gestación fue significativamente mayor en el grupo 3 (155.6 ± 1.3 días) y significativamente menor en el grupo 1 (146.6 ± 1.1 días) ($P < 0.05$). El mayor peso de los corderos al nacimiento se obtuvo en el grupo 1 (5.64 ± 0.4 kg), mientras que el menor peso fue el del grupo 2 (2.42 ± 0.4 kg) ($P < 0.05$). La longitud de la placenta fue similar en todos los grupos, mientras que el ancho de la placenta fue significativamente mayor en el grupo 4 (32.4 ± 2.3 cm) y significativamente menor en el grupo 2 (19.25 ± 2.6 cm). El número de cotiledones fue mayor en el grupo 5 (76.8 ± 4.6) y significativamente menor en el grupo 2 (55.5 ± 5.1). En el área de los cotiledones existieron diferencias significativas entre los cinco grupos, teniendo el grupo 1 la mayor área (6.54 ± 0.3 mm²) y el grupo 4 la menor (1.75 ± 0.34 mm²) ($P < 0.05$). En cuanto al peso de los cotiledones, éste fue mayor en el grupo 1 (2.93 ± 0.3 gr) y significativamente menor en el grupo 4 (1.35 ± 0.3). Puede concluirse que la administración de progesterona y tadalafil incrementan las concentraciones séricas de hormonas como la Progesterona (P4), el Factor de Crecimiento

Placentario tipo 1 (PIGF-1) y el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular

(VEGF), favorecen el desarrollo placentario e incrementan el peso de las crías al nacimiento, lo cual es fundamental en el caso de una gestación restringida, como la que se establece entre borregos Cimarrón y ovejas domésticas.

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

ABSTRACT

In this study we assessed whether exogenous administration of progesterone and Tadalafil favors placental development and intrauterine fetal growth in hybrid pregnancies between Cimarron sheep and domestic sheep (*Ovis canadensis* X *O. aries*). To do this, hybrid embryos (*O. canadensis* X *O. aries*) were transferred to domestic sheep (*O. aries*). When the ewes were diagnosed as pregnant they were divided into 5 groups : group 1 (n = 5, domestic embryo without treatment) , Group 2 (n = 4 , hybrid embryo without treatment) , group 3 (n = 4 hybrid embryo + P4) , group 4 (n = 4 , hybrid embryo + P4 + Tadalafil) and group 5 (n = 5 hybrid embryo + Tadalafil) . The duration of pregnancy, weight of the newborn lambs, length and width of the placenta, number of cotyledons and their area and weight were determined. The lowest concentrations of P4 occurred in group 2 throughout gestation, whereas the highest concentrations of PIGF -1 during the second and last third of pregnancy were found in group 2. Within each type of hybrid pregnancy the highest concentrations of VEGF were obtained during the second and last third of all groups with hybrid pregnancies. The length of gestation was significantly larger in group 3 (155.6 ± 1.3 days) and significantly shorter in group 1 (146.6 ± 1.1 days) ($P < 0.05$). The greatest weight at birth was obtained in group 1 (5.64 ± 0.4 kg), while the lowest weight was in group 2 (2.42 ± 0.4 kg) ($P < 0.05$). The length of the placenta was similar in all groups, while its weight was larger in group 4 (32.4 ± 2.3 cm) and smaller in group 2 (19.25 ± 2.6 cm). The number of cotyledons was larger in group 5 (76.8 ± 4.6) and lower in group 2 (55.5 ± 5.1). With respect to the area of the cotyledons there were significant differences among the five groups, with group 1 having the largest area (6.54 ± 0.3 mm²) and group 4 the smallest (1.75 ± 0.34 mm²) ($P < 0.05$). The weight of the cotyledons was higher in group 1 (2.93 ± 0.3 g) and significantly lower in group 4 (1.35 ± 0.3). It can be concluded that administering progesterone and tadalafil increased serum concentrations of hormones progesterone (P4), placental growth factor type 1 (PIGF - 1) and Vascular Endothelial Growth factor (VEGF), favoring placental development and resulting in increased weight at birth. These

effects could be essential in the case of a restricted gestation, like the one established between Bighorn sheep and domestic sheep.

Keywords: *Ovis canadensis*, *Ovis aries*, restricted gestation, placenta, progesterone, VEGF, PIGF -1, Tadalafil.

I. INTRODUCCIÓN

Una inadecuada vascularización y un menor tamaño de la placenta a lo largo de la gestación, condición que se denomina crecimiento intrauterino restringido (IUGR), origina un menor crecimiento fetal intrauterino y el nacimiento de crías pequeñas (Wu *et al.*, 2008; Fowden *et al.*, 2010).

Inicialmente esta condición fue observada en mujeres con pre-eclampsia cuyos productos al nacimiento presentaron un tamaño menor al normal (Malamitsi *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2008; Ahmed *et al.*, 2009). Son numerosos los factores que se pueden relacionar con el desarrollo de la placenta y el crecimiento fetal, incluyendo la participación fundamental de hormonas como la progesterona, el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y el factor de crecimiento placentario tipo 1 (PIGF-1), los dos últimos considerados como los principales reguladores de la angiogénesis placentaria. Los modelos para el estudio de estos el IUGR han sido mujeres con pre-eclampsia y los niños recién nacidos con evidente retraso en su crecimiento (Malamitsi *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2008; Ahmed, 2009).

También se han desarrollado modelos animales para provocar IUGR. En algunos de ellos se hace disminuyendo el flujo sanguíneo entre la placenta y el feto mediante la ligadura de una de las arterias umbilicales fetales (Miller *et al.*, 2009). En otros se limitan los sitios de implantación entre el endometrio y la placenta mediante la resección parcial de las carúnculas endometriales (Owens *et al.*, 1989). También se estudian las placentas y crías durante condiciones que provocan restricción de la vascularización placentaria y menor crecimiento intrauterino, como las camadas numerosas (Wu *et al.*, 2006; Gootwine *et al.*, 2007; Lassala *et al.*, 2011). También se ha restringido la alimentación o se ha sobrealimentado a las hembras gestantes para evaluar los efectos de la nutrición sobre el desarrollo placentario, cotiledonario o fetal y sobre las concentraciones de diferentes hormonas, aminoácidos y metabolitos esenciales (Lassala *et al.*, 2009; Satterfield *et al.*, 2010; Lassala *et al.*, 2011).

Un modelo novedoso y consistente para el estudio de gestaciones con IUGR, es el establecido al producir gestaciones híbridas entre especies filogenéticamente lejanas, como la oveja doméstica (*Ovis aries*) y el borrego Cimarrón (*Ovis canadensis*), ya que ese ha demostrado que en gestaciones resultantes de dicha cruce existe pobre desarrollo de la placenta y el producto.

La producción de hembras híbridas se contempla como una opción viable para la multiplicación de especies amenazadas o en peligro de extinción, como es el caso del borrego Cimarrón (*Ovis canadensis mexicana*) en México (Mejía *et al.*, 2001, 2008). 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).

En México el borrego Cimarrón se encuentra en la categoría de “Protección Especial” de acuerdo con la norma oficial NOM-059-ECOL-2001. Las poblaciones de esta especie en México se encuentran registradas en el apéndice II del CITES ubicándolas como una especie amenazada y otorgándoles protección adicional al controlar la exportación de cualquier parte del animal.

Debido a la situación del Cimarrón, se han derivado diversas investigaciones para su conservación, en una de éstas se demostró que al transferir embriones puros de cimarrón a ovejas receptoras domésticas los embriones no logran implantarse, lo que se atribuyó a un posible fallo en el reconocimiento materno de la gestación. Sin embargo, en el mismo estudio también se vio que sí es posible llevar a cabo la implantación de embriones cimarrón si se utilizan como receptoras ovejas híbridas (F1), confirmándose este hecho a través de la ultrasonografía de imagen 40 días después de la transferencia, donde se logró identificar cavidades llenas de líquido, placentomas, amnios, cordón umbilical y el latido cardíaco. Desafortunadamente dicha gestación se perdió en día 156, aproximadamente 20 días antes de la ocurrencia del parto de una hembra

Cimarrón en condiciones naturales. Esta falla gestacional se atribuyó a un desarrollo placentario incapaz de soportar el rápido crecimiento de sus estructuras 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 mantener una gestación de embriones cimarrón (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 ± 1.41 días), que la de una gestación normal de oveja doméstica. Además, en las gestaciones híbridas hay menores concentraciones de progesterona sérica a lo largo de la gestación, un inadecuado desarrollo placentario, vascularización disminuida, así como menor número y tamaño de cotiledones, todo lo cual resulta en el nacimiento de crías de bajo peso y tamaño (Calderón, 2009; Gómez, 2013). Además se han observado mayores niveles séricos de VEGF en gestaciones híbridas que en gestaciones domésticas y una mayor concentración sérica de PIGF-1 en gestaciones (*Ovis aries* x *Ovis aries*), que en gestaciones híbridas (*Ovis aries* x *Ovis canadensis*) (Gómez, 2013).

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). 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 tanto hacia la circulación materna como a la fetal (Neill, 2005).

El mantenimiento de la gestación 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).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

Generalidades Reproductivas del Ovino Doméstico y el Borrego Cimarrón.

Ciclo Estral

El periodo de actividad reproductiva tanto en las borregas domésticas como en las cimarrón está centrado en las estaciones de otoño e invierno (especie poliéstrica estacional de días cortos) (Rosa y Bryant, 2003). 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).

En las ovejas domésticas el ciclo estral tiene una duración aproximada de 17 días y está controlado principalmente por la actividad del ovario, de modo que se diferencian dos etapas, la folicular y la lútea. La fase folicular es aquella en la que los folículos en desarrollo secretan estradiol (E2), la cual incluye el proestro, con una duración de 2 a 3 días y caracterizado por un crecimiento folicular rápido y la secreción de estrógenos bajo la estimulación de las gonadotropinas hipofisarias, hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH), así como el estro, que tiene una duración de uno a dos días. La aceptación de la hembra al apareamiento es la conducta más notoria en el estro (Evans *et al.*, 2000; Evans, 2003) y la ovulación ocurre hacia el final del mismo (24 a 36 horas después de su inicio). La fase lútea es dominada por uno o varios cuerpos lúteos que produce(n) progesterona (P4). Dentro de esta fase está incluido el metaestro, con una duración de 3 días y que abarca desde que termina el estro hasta que se completa la formación del cuerpo lúteo, y el diestro, que dura de 9 a 10 días y es la fase dominante del ciclo y se

caracteriza por la plena funcionalidad del cuerpo lúteo (Hansel y Convey, 1983; Senger, 2003).

Fase folicular

Durante esta fase, los folículos dominantes presentes en el ovario al terminar una fase lútea evolucionan hacia folículos ovulatorios. El desarrollo folicular en la oveja ocurre en forma de ondas u oleadas, con 3 ó 4 ondas en cada ciclo estral (Evans *et al.*, 2000). En cada onda se diferencian varias etapas, distinguiéndose el reclutamiento inicial a partir de folículos sensibles a gonadotropinas, la posterior selección de folículos viables, y la evolución final de un folículo dominante, mientras que el resto de los integrantes de la oleada sufren regresión o atresia (Evans, 2003).

El fenómeno de reclutamiento ocurre sobre los folículos sensibles a gonadotropinas hipofisarias, que se caracterizan por su capacidad de iniciar la síntesis de hormonas esteroides en respuesta a las hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH) (Driancourt, 2001). Los folículos reclutados y seleccionados continúan creciendo hasta que uno o varios adquieren dominancia, caracterizada su la presencia de receptores para LH en sus células de la granulosa, así por la secreción de cantidades importantes de E2 e inhibina. Esta última hormona actúa a nivel hipofisario disminuyendo la secreción de FSH, lo que provoca que los folículos pertenecientes a la oleada pero que no son dominantes sufran atresia. Al mismo tiempo el E2 estimula la producción pulsátil de LH (González-Bulnes *et al.*, 2004), cuyos pulsos van aumentando de amplitud hasta que tiene lugar una gran descarga conocida como “pico preovulatorio de la LH”, a partir del cual se inician los fenómenos que conducen a la destrucción de la pared del folículo ovulatorio y a la liberación del oocito para que pueda ser fecundado.

Fase lútea

Tras la ovulación se forma el cuerpo lúteo (CL) por acción de la LH. Las células foliculares se diferencian en células lúteas, cuya capacidad esteroidogénica se centra en la producción de P4. La liberación de progesterona por el CL es mantenida por la acción de diversas hormonas, entre las que destaca la LH. La elevada concentración de P4 ejerce una retroalimentación negativa sobre el hipotálamo durante la fase lútea, inhibiendo la liberación frecuente de GnRH y de gonadotropinas, lo que impide el desarrollo final (preovulatorio) de los folículos dominantes que se desarrollen a partir de oleadas foliculares llevadas a cabo durante la fase lútea temprana o intermedia manteniéndose esta situación hasta que finalice la fase lútea con la destrucción del CL (Díaz *et al.*, 2002; Niswender *et al.*, 2002).

En caso de no producirse la gestación el cuerpo lúteo sufre una regresión o luteolisis mediada por la prostaglandina F2 α (PGF2 α), fundamentalmente de origen uterino aunque las células lúteas también tienen la capacidad de producirla. Además de alterar la capacidad esteroidogénica de las células lúteas, la PGF2 α influye sobre el aporte sanguíneo al CL. Los cambios morfológicos que se suceden durante la luteolisis incluyen la degeneración de los capilares sanguíneos, el acúmulo de vacuolas lipídicas en las células lúteas y un aumento del número de lisosomas. La caída en las concentraciones de P4 permite el incremento en la frecuencia de secreción de GnRH y de gonadotropinas necesario para la maduración de un nuevo folículo ovulatorio y el inicio de un nuevo ciclo (Díaz *et al.*, 2002).

Hasta el momento no se conocen con detalle las características de las fases del ciclo estral de las hembras de borrego Cimarrón (Monson y Summer, 1990). Se sabe que el ciclo estral en esta especie dura alrededor de 28 días, y el estro tiene una duración aproximada de 48 horas, pero se desconocen las características y la duración de las otras fases del ciclo (proestro, metaestro y diestro). También se sabe que la duración de la gestación es distinta entre las

ovejas domésticas (146 a 150 días) y las hembras Cimarrón (175 a 179 días). Las ovejas Cimarrón tienen normalmente solo una cría por parto, aunque se han reportado algunos partos gemelares (Monson y Sumner, 1980; Álvarez y Medellín, 2005).

Pre-implantación

En el periodo de pre-implantación, el cigoto formado luego de la fertilización se divide en 2 blastómeros idénticos, comenzando la etapa de segmentación, durante la cual los blastómeros se siguen dividiendo hasta formar una mórula. Una vez fecundado, el cigoto desciende por el oviducto y alcanza el útero alrededor del día 4 post-coito. Allí experimenta una serie de cambios estructurales que le permiten adaptarse al ambiente materno. Alrededor del día 6 post-coito se produce la evolución a blastocisto, constituido por una cavidad (blastocelo) rodeada por una monocapa celular (trofoectodermo), el cual rodea a un pequeño grupo celular, llamado masa celular interna, a partir del cual se desarrollará el embrión (Duranthon *et al.*, 2008). Posteriormente, entre los días 8 y 9 después de la fertilización se rompe la zona pelúcida y el blastocisto eclosiona exponiendo la superficie del trofoblasto al medio uterino (Roberts *et al.*, 2008). En este proceso, denominado “eclosión”, la zona pelúcida se desgarrra y el blastocito sale a través de dicha abertura, con lo que el trofoectodermo queda en contacto directo con el líquido uterino. Durante los días siguientes el blastocito continúa creciendo y desarrollándose (Spencer *et al.*, 2007).

En los rumiantes y en los porcinos, el blastocisto eclosionado comienza a alargarse en la denominada fase de elongación, cambiando de una forma esférica a una forma tubular/filamentosa alrededor del día 10 y 11 de la gestación. Durante esta fase de elongación se forman las membranas extraembrionarias, pasando a denominarse *conceptus* (embrión y sus envolturas) (Spencer *et al.*, 2004).

El trofoblasto del blastocito tubular se alarga en forma de filamento, alcanzando una longitud de casi 25 cm hacia el día 17 de la gestación. El crecimiento del trofoblasto provoca que el blastocito abarque todo el espacio intrauterino y se inmovilice (Spencer *et al.*, 2007). El embrión se nutre del histotrofo, constituido por secreciones del epitelio luminal y glandular del endometrio bajo la influencia de la progesterona (Spencer *et al.*, 2007).

Una vez iniciada la fase de elongación, el trofoectodermo emite una señal que origina el reconocimiento de la gestación por parte del uterino, evitando que se desencadene el mecanismo luteolítico y que se inicie un nuevo ciclo estral (Spencer *et al.*, 2004).

El reconocimiento de la gestación comprende el proceso fisiológico por el que el embrión indica su presencia a la madre para prolongar la vida del CL, evitando una caída en la concentración de P4. En los rumiantes, la luteolisis es prevenida por la acción de la molécula Interferón-tau (IFN-t) (Spencer *et al.*, 2004), la cual es secretada por las células mononucleares del embrión. Esta molécula es considerada como la señal de reconocimiento maternal de la gestación en los rumiantes (Roberts *et al.*, 1996).

Inicialmente, IFN-t fue descrito como proteína trofoblástica ovina (Godkin *et al.*, 1984) pasando luego a denominarse IFN-t al demostrarse que poseía características similares a las de otras proteínas pertenecientes a la familia de interferones de tipo I (Imakawa *et al.*, 1987; Salamonsen *et al.*, 1988; Roberts *et al.*, 2008).

Desde el estado de blastocisto es posible detectar niveles bajos de ARNm para IFNT-t y de la proteína IFN-t, incrementándose su producción drásticamente alrededor del día 10 de la gestación al iniciarse la fase de elongación del embrión y su orientación sobre la superficie endometrial (Ealy y Yang, 2009). Las células del trofoectodermo continúan produciendo el IFN-t entre el día 10 y 25 (Song *et al.*, 2008). Además se ha detectado la presencia de receptores para interferón en embriones de días 15 y 16 días de edad, por

lo que se ha considerado la posibilidad de una actividad autocrina de IFN-t como regulador de su propia secreción (Imakawa *et al.*, 2002). Tras alcanzar una concentración máxima en el día 14 a 16 de la gestación, la expresión de IFN-t disminuye hasta dejar de ser detectable a partir del día 25 (Spencer *et al.*, 2004). El efecto antiluteolítico de esta molécula embrionaria se basa en inhibir la liberación pulsátil de PGF2 α por parte del útero. Para ello el IFN-t actúa de forma paracrina sobre el endometrio, bloqueando la expresión de receptores para oxitocina (OT) como consecuencia de la inhibición previa de receptores para estrógenos (Spencer *et al.*, 1995). Al impedir el incremento de receptores para estrógenos en el epitelio luminal y glándulas superficiales del útero alrededor del día 13 de la gestación, el IFN-t inhibe indirectamente la expresión de los receptores para OT en estos compartimentos, debido a que el gen de este receptor incluye elementos de respuesta a estrógenos en su sitio regulador. La inhibición de la expresión de los receptores para OT interfiere con la liberación pulsátil de PGF2 α , aunque sin alterar la producción basal de prostaglandinas (Dorniak *et al.*, 2011), por lo que las ovejas gestantes sí secretan PGF2 α , pero lo hacen en forma de una elevación constante de sus concentraciones basales en lugar de liberarla en forma de los pulsos que se requieren para producir la luteolisis en la oveja (Zarco *et al.*, 1988).

Implantación

En la oveja, la implantación consiste en la unión superficial (no invasiva) entre el trofoectodermo embrionario y el epitelio endometrial. En cambio, los carnívoros, roedores y primates tienen una implantación invasiva, ya que el blastocisto alcanza los vasos sanguíneos del estroma (Bazer *et al.*, 2009). El proceso de implantación en la especie ovina se inicia el día 15-16 de gestación, no completándose hasta los días 50-60 (Spencer *et al.*, 2004).

La implantación se inicia con la fase de aposición en los días 12-15, que consiste en la unión inestable del embrión al endometrio. El trofoectodermo desarrolla unas proyecciones citoplásmicas que forman interdigitaciones con el

epitelio uterino e invaden los conductos superficiales de las glándulas (Bazer *et al.*, 2009). Esta unión temprana del trofoectodermo al endometrio parece requerir la pérdida de componentes anti-adhesivos en las células del epitelio luminal y de las glándulas superficiales. En la oveja y en la cerda, la implantación se inicia cuando disminuye la expresión de la glicoproteína mucina 1 a nivel del endometrio, coincidiendo con la desaparición del receptor de progesterona alrededor del día 11. Esta sustancia actúa como una barrera que impide la adhesión, y su pérdida permite la exposición de los receptores de diversos componentes, fundamentalmente integrinas y glicoproteínas implicadas en la adhesión entre el epitelio endometrial y el trofoblasto (Johnson *et al.*, 2001; Spencer *et al.*, 2004).

Las integrinas son una familia de receptores transmembranales que intervienen en la transducción de señales celulares reguladoras de los procesos de adhesión (Johnson *et al.*, 2001). A diferencia de otras especies, la expresión de las integrinas en el epitelio luminal y glandular de la oveja es constitutiva y no está influenciada por la existencia de una gestación, por lo que la receptividad del útero ovino a la implantación parece estar determinada por otras sustancias, entre las que destacan la osteopontina, que ejerce de ligando de las integrinas, y la galectina-15 propia del endometrio ovino y caprino (Spencer *et al.*, 2004; Bazer *et al.*, 2009).

En la especie ovina, la unión al endometrio comienza cuando las células gigantes binucleadas del trofoblasto se fusionan con el epitelio luminal caruncular formando un sincitio de células trinucleadas. La fusión de estos sincitios crea unas placas que cubren la superficie de la carúncula colaborando en la formación de los placentomas (Spencer *et al.*, 2004; Bazer *et al.*, 2009).

Membranas Placentarias

Las membranas placentarias aseguran la protección, nutrición, respiración y eliminación de desechos metabólicos del embrión. Son estructuras que se

desarrollan a partir del cigoto, pero que no forman parte del embrión propiamente dicho. Están constituidas por tejidos vivos extraembrionarios, pero en continuidad con los del propio embrión, los cuales se presentan en forma de bolsas y divertículos. Dado que facilitan el intercambio entre los vasos embrionarios y maternos, pueden presentar una importante vascularización.

El saco vitelino se forma a partir de un divertículo del intestino, cuyas paredes están formadas por el endodermo recubierto externamente por el mesodermo de la esplacnopleura. Al principio del desarrollo el saco vitelino tiene un papel trófico y respiratorio, y se forman los primeros islotes sanguíneos en sus paredes.

El amnios tiene una pared constituida por ectodermo extraembrionario y mesodermo. El alantoides se desprende del intestino posterior, el cual está formado por el endodermo y mesodermo de la esplacnopleura. El alantoides se desarrolla rápidamente y pronto establece contacto con el corion para formar el alantocorion, que entra en contacto con la mucosa uterina. Entre ambos, el alantocorion (placenta fetal) más la mucosa uterina (placenta materna), forman la placenta, cumpliendo la función de establecer contacto con el útero y ser un órgano de intercambio entre el embrión y el organismo materno en ambos sentidos: hacia el feto y hacia la madre. El corion es la envoltura más externa, que encierra al embrión y a todas las estructuras precedentes, está formado por una capa externa, el trofoblasto, y otra interna, íntimamente adherida al mesodermo (Climent y Bascuas, 1989).

El amnios se cierra muy pronto (pleuroamnios), en la oveja entre el día 15 y 18. El líquido amniótico es de color grisáceo o amarillo claro. Es de llamar la atención el número de excreciones epiteliales del amnios, que constituyen unas estratificaciones blanco grisáceas de tamaño variables, que forman apéndices dentados en la vaina amniótica del cordón umbilical. El alantoides, se desarrolla rápidamente, pero no rodea al amnios por completo, quedando la parte dorsal al descubierto. El líquido alantoideo es acuoso, de color amarillo claro, puede contener corpúsculos verdosos o grisáceos que se consideran

como hipómanes, con un efecto estimulante sobre la producción láctea. El corion se encuentra cubierto de vellosidades primarias a los 15-16 días, los cotiledones están formados a los 40.5 días y se ensamblan con las carúnculas al final del segundo mes. El cordón umbilical es relativamente corto, de un cuarto de la longitud del feto y posee solo un segmento amniótico. El cordón umbilical lo integra exclusivamente el pedículo alantoideo, por donde discurren dos arterias y dos venas, que confluyen en una antes de penetrar en el embrión (Climent y Bascuas, 1989).

Antes de la implantación el embrión es avascular ya que el alantoides aparece hacia el día 15 de la gestación y en el mesodermo se comienzan a formar los vasos sanguíneos. Sin embargo, la velocidad de la formación de vasos sanguíneos es menor que la de expansión del corion avascular, dejando así grandes áreas desprovistas de vasos sanguíneos lo cual es evidente hasta aproximadamente el día 32 de la gestación, cuando la mayor parte del alantoides ya está vascularizado. Sin embargo, hay variaciones individuales en este aspecto, pues a la misma edad, el área vascular del corioalantoides es diferente cuando se comparan diferentes embriones (Rodríguez *et al.*, 2005).

Placenta

En los mamíferos el crecimiento y la sobrevivencia del feto durante su desarrollo dependen exclusivamente de la placenta, conformada por tejidos maternos y fetales. El componente fetal está representado por el corion, el cual de acuerdo al tipo de placentación, está asociado con el saco vitelino o con el alantoides. Por su parte el componente materno está dado por la zona más superficial del endometrio uterino.

Antes de la formación de la placenta se producen diversas modificaciones en las envolturas embrionarias y en la mucosa uterina, es decir, en las estructuras que van a entrar en contacto una con otra. En primer lugar se forman en la superficie del corion las vellosidades primarias, simples evaginaciones

trofoblásticas. Estas adquieren una base conjuntiva por donde penetran los vasos, transformándose en vellosidades secundarias, que aumentan la superficie y se hunden en la mucosa del útero (Roa *et al.*, 2012).

Las vellosidades secundarias no se forman necesariamente en toda la superficie del corion, sino que pueden existir zonas donde el corion aparece como una envoltura lisa provista de un epitelio alto que contacta simplemente con la mucosa uterina, donde se formarán unas zonas de corion dotadas de vellosidades (corion frondoso) y otras desprovistas de ellas (corion liso) (Climent y Bascuas, 1989).

La placenta forma una verdadera interfase entre la circulación materna y fetal, facilitando el intercambio gaseoso y metabólico entre la circulación fetal y materna. Además posee la capacidad de secretar hormonas y producir una barrera entre ambos sistemas inmunes facilitando la supervivencia del feto en el útero.

La placenta es una estructura carente de inervación, por lo cual la comunicación entre madre y feto se establece mediante sustancias que viajan por vía sanguínea. Éstas pueden ejercer una acción local actuando en la misma placenta o bien a distancia a nivel uterino o en el mismo feto (Gudea *et al.*, 2004). La placenta está destinada al intercambio fisiológico entre la madre y el feto, siendo el intercambio gaseoso la función primordial de este órgano, seguida por la absorción de nutrientes y la excreción de productos de desecho. Los diferentes componentes de este intercambio son transportados por difusión simple (O₂ y CO₂), difusión facilitada y mediante transporte activo altamente selectivo (Watson y Cross, 2005).

Existe en la placenta una intensa actividad de intercambio y de síntesis, pasando de la madre al feto sustancias nutritivas, tales como oxígeno, agua, glucosa, lactato, aminoácidos, ácidos grasos libres, vitaminas, electrolitos, hormonas, anticuerpos, algunos medicamentos y algunos patógenos. Del feto a

la madre, en cambio, pasan productos finales del metabolismo, tales como urea y anhídrido carbónico (Gudea *et al.*, 2004).

Clasificación de las Placentas

Un criterio para clasificar la placenta considera el tipo de relación que se establece entre la madre y el feto según el origen vascular. Otro criterio es el anatómico y un tercero es el histológico.

Clasificación de las placentas según el origen vascular. En los mamíferos la placenta se desarrolla inicialmente como una placenta coriovitelina. Este tipo de placentación se establece cuando la pared del saco vitelino se une con el corion, este tipo de placenta prontamente experimenta un proceso de involución. En cambio la placenta corioalantoidea se establece cuando se fusiona el alantoides con el corion. La placenta corioalantoidea se constituye tardíamente y es la definitiva, estableciéndose como un eficiente mediador de los intercambios fisiológicos entre la madre y la cría (Rojas y Rodríguez, 1987).

Clasificación morfológica de las placentas. Según la forma en que se distribuyen las vellosidades coriónicas en la placenta, existe la siguiente clasificación anatómica. En los rumiantes las vellosidades coriónicas se agrupan en rosetas llamadas cotiledones que se relacionan con las carúnculas endometriales, dando origen a una placenta cotiledonaria. Las estructuras uterinas y coriónicas en conjunto conforman una estructura llamada placentoma. En ovinos, bovinos y caprinos durante las primeras etapas de la placentación se observa que el corion tiene vellosidades distribuidas uniformemente en forma similar a los cerdos, pero pronto estas vellosidades coriónicas se redistribuyen agrupándose en rosetas llamadas cotiledones, dejando otras áreas libres de vellosidades para originar el corion liso. Se sabe que es el contacto del epitelio coriónico con las carúnculas uterinas el responsable de la formación de vellosidades que formarán los cotiledones fetales, cuyo número en las ovejas fluctúa entre 90 y 100 (Hafez, 2002,

Sammin *et al.*, 2009). En las áreas de corion liso entre los cotiledones se encuentran vellosidades muy pequeñas que hacen contacto con la mucosa intercaruncular del endometrio, que posee muchas glándulas (Rojas y Rodríguez, 1987). En los ovinos la forma del placentoma es cóncavo (Schmidt, 2005, Sammin *et al.*, 2008).

Clasificación histológica de la placenta. Esta clasificación se basa en el número de barreras que se interponen entre la sangre fetal y la materna, su número máximo es de seis, tres fetales y tres maternas. Los tejidos fetales son los siguientes: epitelio del corion fetal (trofoblasto), tejido conjuntivo (mesénquima) y endotelio del capilar fetal. Los tejidos maternos son: epitelio de la mucosa uterina, tejido conjuntivo materno, endotelio de los capilares maternos. En la placenta de tipo epiteliocorial las vellosidades coriónicas contactan con el epitelio de la mucosa uterina, existiendo interdigitaciones entre ambos tejidos. Este tipo de placenta se presenta en porcinos y equinos. La placenta sindesmocorial o conjuntivocorial es aquella en la que el corion contacta con el tejido conjuntivo materno y en la cual falta la capa epitelial. Es la placenta de ovinos y bovinos, aunque debe destacarse que inicialmente la placenta es epiteliocorial (Dellmann, 1993). El feto en los rumiantes forma células trofoectodérmicas binucleadas que invaden y se unen al útero para formar células multinucleadas y ocupar el denominado sincitiotrofoblasto, desarrollando una placenta epiteliocorial. Las células binucleadas producen, entre otros elementos, el lactógeno placentario, el cual estimula el desarrollo y secreción de la glándula mamaria, y el crecimiento de órganos fetales y la placenta (Roa *et al.*, 2012).

Placenta decidua y adecidua. La expulsión de la placenta fetal después del parto provoca una hemorragia acompañada de la eliminación de una parte de tejido uterino destinada a ser eliminada en el parto. Esta parte se denomina decidua o caduca y sucede en las placentas de tipo hemocoriales y endoteliocoriales. Las placentas de tipo epiteliocoriales y sindesmocoriales son

adecuadas, ya que su expulsión no produce nunca hemorragia y el tejido conectivo del útero permanece intacto (Climent y Bascuas, 1989).

Los placentomas son las unidades estructurales de las placentas de los rumiantes. Están constituidos por la interdigitación de vellosidades fetales cotiledonarias con el tejido caruncular materno. A través de ellos se realiza el intercambio de nutrientes y de gases entre la madre y el feto (Wooding, 2008).

Borowicz et al (2007) determinaron que la vascularización del tejido caruncular se incrementa continuamente desde el día 50 de la gestación hasta el día 140, mientras que la del tejido cotiledonario se incrementa el doble que ésta durante el mismo período. Además, el crecimiento en el tejido caruncular se acompaña por un pequeño aumento del número de capilares y un gran incremento del diámetro capilar, mientras que en el tejido cotiledonario hay un gran aumento del número de capilares con una disminución en el diámetro capilar.

El crecimiento de la placenta y el incremento del flujo sanguíneo para el mantenimiento de la preñez dependen de una apropiada red vascular, la cual surge de la vasculogénesis y la angiogénesis. Ambos procesos son regulados por diversos factores y sus receptores (Reynolds *et al.*, 2005). Los trabajos realizados en placentas de ovejas indican que el desarrollo vascular de los tejidos placentarios, tanto en la porción caruncular como en la cotiledonaria, comienzan en la preñez temprana y continúan durante toda la gestación (Reynolds and Redmer, 2001; Reynolds *et al.*, 2005 ; Vonnahme *et al.*, 2006).

El flujo sanguíneo umbilical y uterino aumentan exponencialmente durante la gestación y esto depende del desarrollo del lecho vascular placentario (Reynolds, 2005). La arquitectura microvascular del tejido cotiledonario está compuesta de abundantes capilares pequeños, los cuales aseguran un transporte sanguíneo rápido, lo que favorece el intercambio feto-materno (Reynolds y Redmer 2001; Reynolds *et al.*, 2005).

Dentro de las características del cotiledón se ha demostrado que el hilio o depresión central tiene una función primordial en el intercambio con la madre, ya que es en esta zona donde se realiza el intercambio vascular y la fagocitosis de los eritrocitos maternos. Así, el suministro de sangre materna a la placenta se deriva de las arterias y venas uterinas, en donde las arterias umbilicales llevan sangre del feto a la placenta y las venas umbilicales de la placenta al feto. La circulación fetal es esencialmente similar a la del adulto, excepto que la oxigenación de la sangre ocurre en la placenta y no en los pulmones. Además, una parte de la sangre de la vena umbilical se desvía a través del conducto venoso, fluyendo desde el hígado hacia la porción caudal de la vena cava, para evitar el metabolismo (Burton *et al.*, 1976; Reynolds *et al.*, 2005; Braun *et al.*, 2007).

Angiogénesis Placentaria

La vasculogénesis y la angiogénesis son dos procesos consecutivos para el desarrollo de los vasos sanguíneos en la placenta. El citotrofoblasto dispara la vasculogénesis y la angiogénesis, y mientras la gestación progresa las células estromales y de Hofbauer toman la tarea de activar el desarrollo de los vasos sanguíneos (Espinosa, 2011).

Durante la vasculogénesis, se logra la formación de vasos primitivos tempranos por diferenciación *in situ* de células madre hemangiopoyéticas, que se derivan de las células mesenquimales pluripotenciales. Las células madre hemangiogénicas posteriormente se diferencian en células madre hemangioblásticas que dan origen a las células angioblásticas, progenitoras de las células endoteliales, así como a las células hemangioblásticas, progenitoras de las células hematopoyéticas (Ribatti *et al.*, 2002).

La angiogénesis ha sido utilizada para describir la migración de los angioblastos, el desarrollo de células endoteliales de los vasos sanguíneos

preexistentes y los brotes de las células endoteliales (Charnock-Jones *et al.*, 2004).

En todos los tipos de angiogénesis, aún bajo condiciones fisiológicas o patológicas, la activación de las células endoteliales es el primer proceso que ocurre, llevando al incremento de la permeabilidad vascular. El principal objetivo del proceso es asegurar el flujo sanguíneo. Diferentes factores afectan la angiogénesis y la vasculogénesis en forma autocrina o paracrina, al igual que directa o indirectamente, estimulando la proliferación y diferenciación de las células precursoras endoteliales (Ferrara, 2004).

Las células endoteliales constituyen la unidad funcional central de las estructuras vasculares y se especializan en realizar varias funciones de importancia crítica. Estas incluyen: mantenimiento de la integridad vascular, regulación del estado trombotico, funciones de transporte / barrera y también actúan como transductores y efectores de estímulos locales. En la vida embrionaria las células endoteliales se forman de las células progenitoras primitivas, las cuales aumentan en número, se organizan y ensamblan en redes vasculares ordenadas. Las células endoteliales vasculares (y células perivasculares, incluyendo los pericitos) responden a factores locales, los cuales en el adulto generalmente mantienen una condición estable. Sin embargo, las variaciones agudas en la perfusión producen alteraciones en el flujo, presión parcial de oxígeno y nutrientes, llevando a alteraciones en el metabolismo de la célula endotelial, crecimiento del árbol vascular y maduración de los vasos (Evans *et al.*, 2000).

Existen tres pasos de vasculogénesis y angiogénesis placentaria durante la maduración de las vellosidades. El primer paso, la vasculogénesis, comienza con las células madres hemangiogénicas inducidas para diferenciarse en una forma paracrina por el VEGF producido por el citotrofoblasto. El segundo paso, la angiogénesis de tipo I, comienza con la formación de redes neovasculares que aparecen paso a paso durante la angiogénesis, inducida por los factores

de crecimiento derivados de las células citotrofoblásticas y de Hofbauer. En el siguiente paso, la angiogénesis de tipo II comienza con la diferenciación de las células perivasculares, incluyendo precursores de las células musculares lisas (células similares al miofibroblasto) para formar vasos contráctiles. Este proceso es regulado por la inducción de los factores de crecimiento y citocinas derivados del ambiente local de las vellosidades al igual que la circulación fetal ya establecida (Demir *et al.*, 2006).

Numerosos estudios han indicado que la angiogénesis es de hecho, un componente importante del aumento en el flujo de sangre durante toda la gestación en la placenta. Así, veinticuatro días después del parto, la densidad vascular de la mucosa del útero, o endometrio, muestran un aumento dos veces mayor (Reynolds y Redmer, 1992). Mientras que la densidad vascular del endometrio (placenta materna) sigue aumentando poco a poco a lo largo de la gestación, en contraste, la densidad vascular de los tejidos fetales de la placenta, o cotiledones, aumenta de manera relativamente constante hasta la mitad de la gestación, para después aumentar dramáticamente. Así, el crecimiento y el desarrollo de la cama vascular es un componente crítico de crecimiento de tejido, incluyendo la del útero- placenta (Reynolds y Redmer, 2001; Reynolds *et al.*, 2005).

En este modelo, los lechos capilares carunculares crecen principalmente por el aumento de tamaño de los capilares, con sólo pequeños aumentos en el número capilar o densidad de la superficie, lo que resulta en un aumento de 3.3 veces en la densidad de área capilar. En contraste, los lechos capilares de los cotiledones crecen principalmente por ramificación, resultando en un aumento grande, como 12.3 veces en el número capilar o densidad, acompañada de una disminución en el tamaño capilar (Reynolds *et al.*, 2005).

Además, debido al aumento de la ramificación y el número más grande de capilares por unidad de tejido, el área de superficie disponible para el intercambio es mayor en los cotiledones fetales en comparación con las

carúnculas maternas durante el último trimestre de gestación (Reynolds *et al.*, 2005). Además, el espesor de la barrera entre el feto y la madre también pueden ser reducidos durante la gestación (Faber y Thornburg, 1983; Longo, 1987). Tomados en conjunto, estas observaciones ayudan a explicar por qué la proporción de los nutrientes y el oxígeno consumidos por el útero grávido que se transportan al feto aumenta en 2 a 4 veces desde mediados o finales de la gestación, esencialmente para mantener el ritmo de la tasa de crecimiento fetal (Reynolds y Redmer, 1995).

Por lo tanto, la arquitectura microvascular de la placenta de la oveja es ideal tanto para el transporte de nutrientes en el lado materno y la absorción de nutrientes y el transporte en el lado fetal. Esta disposición, sin embargo, no parece ser única de ovejas. Por ejemplo, hay similitudes en la arquitectura microvascular placentaria y funcional entre las ovejas, las vacas y las cerdas (Reynolds y Redmer, 1992; Reynolds *et al.*, 2005).

Se pueden distinguir dos tipos de angiogenesis patológica, denominadas angiogenesis activada y angiogenesis inhibida, dependiendo de los niveles dominantes de moléculas pro o anti-angiogenicas, respectivamente. Existen diversas condiciones asociadas a la angiogenesis activada, como las enfermedades malignas, además de estar implicada en obesidad, asma, diabetes, cirrosis, esclerosis múltiple, endometriosis, SIDA, infecciones bacterianas y enfermedades auto-inmunes, por el contrario, cuando el interruptor de la angiogenesis se encuentra apagado o es insuficiente, como en el caso de enfermedad isquémica cardiaca o de pre-eclampsia, la angiogenesis inhibida está asociada al mal funcionamiento de las células endoteliales, a la regresión o malformación de los vasos, además de prevenir la revascularización, cicatrización y regeneración (Carmeliet, 2005; Ferrara *et al.*, 2003).

La generación de nuevos vasos fetales se realiza mediante la angiogenesis ramificada, que consiste en la gemación y agrandamiento de los vasos ya

existentes, para formar una red de vasos interconectados característicos de la vasculatura madura. El proceso de maduración vascular incluye la integración de las células endoteliales en una matriz de soporte extracelular, y que los vasos neoformados se rodeen de células de músculo liso y pericitos para conseguir su estabilización (Briones *et al.*, 2005; Widmer *et al.*, 2007). En general, el proceso de angiogénesis se inicia por factores de crecimiento tales como el VEGF, el PlGF y el Factor básico de Crecimiento Fibroblástico (bFGF) (Folkman *et al.*, 1987).

Entre los factores reguladores de la angiogénesis encontramos gran cantidad de sustancias: citoquinas, hormonas y factores de crecimiento, componentes de la matriz extracelular (laminina, fibronectina) y sus receptores (integrinas alfa V), metaloproteinasas de la matriz (MMPs) y sus inhibidores tisulares (TIMPs), proteasas (uroquinas, activador del plasminógeno), fibrina, células inflamatorias y pericitos (Ruiz, 2008).

Moléculas involucradas en la gestación

Progesterona (P4)

La progesterona es una hormona ampliamente relacionada con la gestación, que se encarga de preparar el tracto reproductivo para albergar un embrión en caso de que exista fecundación. Durante los primeros días de gestación estimula la secreción glandular endometrial provoca cambios en el patrón secretor de las células lúteas. En el oviducto y endometrio estimula la producción de proteínas esenciales para la viabilidad espermática y el correcto desarrollo del embrión (Murray, 1995). Además mantiene la quiescencia del miometrio, impidiendo su contracción durante la fase lútea y la posible gestación. La P4 induce una marcada hiperplasia e hipertrofia de las glándulas uterinas, estimulando la síntesis del histotrofo, el cual está constituido por sustancias que contribuirán al desarrollo y crecimiento del embrión (Spencer *et al.*, 2004). Por otra parte, la progesterona estimula el desarrollo del sistema

alveolar de la glándula mamaria, preparándola para la síntesis y secreción de leche (Niswender y Nett, 1994).

En los ovinos la placenta es el principal órgano productor de progesterona después del primer tercio de la gestación, ya que el cuerpo lúteo puede no ser requerido a partir del día 50 de la misma. En los primeros 50 días de la gestación la concentración de progesterona en las borregas domésticas varía entre 1 y 6 ng/ml. A partir del día 50 de la gestación las concentraciones pueden incrementarse hasta alcanzar niveles superiores a los 20 ng/ml (Basset *et al.*, 1969).

Para la síntesis de progesterona en el cuerpo lúteo el principal sustrato es el colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad (LDL), aunque en algunas especies es el colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad (HDL), producidos ambos por el hígado. Sin embargo, el cuerpo lúteo puede sintetizar colesterol a partir de acetato (Chung *et al.*, 1986). Dentro de las células lúteas el colesterol es transportado a las mitocondrias y convertido a pregnenolona por el complejo enzimático llamado citocromo p450_{scc}, en una reacción que requiere electrones, los cuales se obtienen a través de la conversión de adrenoxina reductasa a adrenoxina. La pregnenolona es convertida a progesterona mediante la enzima llamada 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β HSD), localizada en el retículo endoplásmico liso, y una vez sintetizada la progesterona es secretada.

En el cuerpo lúteo la síntesis de progesterona es estimulada por acción de la hormona lutenizante. La LH facilita el transporte del colesterol desde el citoplasma hacia la matriz mitocondrial, lo que permite su conversión en pregnenolona (Ayad *et al.*, 2007). En la placenta también se produce progesterona a partir de colesterol, pero en este órgano el colesterol no puede formarse a partir de acetato, por lo que el único precursor de los esteroides de la placenta es el colesterol materno. Una vez que la placenta produce pregnenolona, esta sustancia se transforma rápidamente a progesterona, ya que existe una gran abundancia del sistema 3 β HSD en este órgano (Chung *et*

al.,1986). 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).

La mayoría de las funciones fisiológicas de la progesterona están mediadas por dos isoformas de su receptor, denominadas, Receptor de Progesterona tipo alfa (RP- α) y Receptor de Progesterona tipo beta (RP- β) (Cheon *et al.*, 2002). Todos los tipos celulares del útero ovino expresan RP, con variaciones espaciotemporales en función de la concentración de hormonas esteroides circulantes y del estado reproductivo en el que se encuentre la hembra. En la oveja, Spencer y Bazer (1995) localizaron el ARNm y la correspondiente proteína de RP durante el ciclo estral y la gestación temprana, demostrando que existen diferencias en los distintos tipos celulares uterinos. Entre los días 1-6 del ciclo, la abundante liberación de E2 por el folículo ovulatorio y la creciente concentración de P4 luteal estimulan la expresión de RP (Ing y Tornesi, 1997), alcanzando concentraciones máximas en el estroma y miometrio, y en menor cantidad en el epitelio luminal y las glándulas superficiales. Posteriormente, la retroalimentación negativa de la P4 disminuye la expresión de RP en los compartimentos epiteliales (Spencer y Bazer FW, 1995).

Se ha observado que los niveles de progesterona son similares entre las ovejas que gestan una o varias crías durante las primeras semanas de gestación, pero a partir de la séptima semana las ovejas que tienen una gestación múltiple presentan mayores concentraciones de progesterona. Sin embargo, en el caso de una gestación con crecimiento intrauterino restringido, como la que se establece entre ovejas domésticas y borregos Cimarrón, el que una oveja geste más de una cría origina que éstas sean todavía más pequeñas y que sus respectivas placentas tengan menor vascularización y tamaño (Calderón *et al.*, 2008; Gómez *et al.*, 2013; Mejía *et al.*, 2011), por lo que en la medida de lo posible debe evitarse que esto ocurra.

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 algunas especies, como es el caso de los ratones, se ha visto que 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).

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).

Factor De Crecimiento Del Endotelio Vascular (VEGF)

Se sabe que el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), promueve la vascularización placentaria, y es un mitógeno específico de células endoteliales. El VEGF regula múltiples funciones de las células endoteliales, incluyendo mitosis, permeabilidad vascular, tono vascular y producción de moléculas vasoactivas. Esta molécula se encuentra en grandes cantidades en tejido placentario y membranas de células fetales, y su expresión se incrementa significativamente durante la gestación (Lyll *et al.*, 1997 Sgambati *et al.*, 2004). El VEGF fue identificado en los años 80s como un factor de permeabilidad vascular (VPF) y como un factor de crecimiento específico de

células endoteliales vasculares codificado por el gen VEGF, por lo que ha sido referido como VEGF, VEGF/VPF o simplemente VPF.

El VEGF es conocido por sus dos principales funciones biológicas, en primer lugar, es capaz de estimular la proliferación celular del endotelio vascular originando la mitogénesis y la angiogénesis de las células endoteliales (Ferrara, 2004). En segundo lugar, tiene una capacidad para aumentar la permeabilidad vascular. De hecho, el VEGF fue originalmente descrito como un factor de permeabilidad (Ferrara *et al.*, 2003). Además de las dos principales características anteriores, actúa VEGF como un factor de supervivencia para el endotelio durante la angiogénesis fisiológica y patológica.

El VEGF es una glicoproteína dimérica de 34 a 45 KDa. Es una citocina multifuncional aislada a partir de las proteínas secretadas en las pequeñas venas hiperpermeables a macromoléculas que rodean los tumores (Senger *et al.*, 1983).

Se reconoce al sistema que incluye al VEGF y sus receptores como el principal regulador de las células endoteliales vasculares y de la formación de vasos sanguíneos (Carmeliet *et al.*, 1999; Ferrara, 2002). El VEGF es un factor de crecimiento con actividad mitogénica altamente específica para las células endoteliales; es miembro de la súper familia de genes VEGF-PlGF que incluye al VEGF-A, -B, -C, -D y -E, así como al factor de crecimiento placentario (PlGF) (Veikkola *et al.*, 2000; Shibuya, 2001; Dvorak, 2005) y cinco principales subtipos de receptores: VEGF-R1 (Flt-1), VEGF-R2 (KDR receptor en humanos, Flk-1 receptor en roedores), VEGF-R3 (Flt-4) (Veikkola *et al.*, 2000; Ferrara, 2003) así como la formas solubles de Flt-1 (sFlt-1) y de Flk-1 (sFlk-1) (Kendall y Thomas, 1993). De esta familia, el VEGF-A es el más estudiado y se le refiere únicamente como VEGF (Rosales y Guzmán, 2011).

El VEGF es el principal regulador de la angiogénesis durante el crecimiento placentario y embriogénesis. Este factor de crecimiento también está implicado

en procesos patológicos que cursan con angiogénesis, como el desarrollo de la vascularización de tumores (Kim *et al.*, 1993).

La implantación y subsecuente placentación del embrión no son posibles si previamente el VEGF no torna receptivo al endometrio para el desarrollo del embrión. Se ha observado que los ratones knock-out para el gen VEGF, pueden concebir pero no producen descendencia viable. La falta del gen de VEGF en estos ratones provoca la muerte embrionaria en etapas tempranas de su desarrollo, lo cual indica el importante rol que tiene este factor de crecimiento en la ruta de señalización para el desarrollo vascular (Espinosa, 2011). El VEGF-A es el miembro principal y más estudiado de esta familia de genes, el cual es codificado por un solo gen organizado en ocho exones separados por siete intrones, siendo una glicoproteína homodimérica de 45 KDa (Ferrara *et al.*, 2003).

Se han reportado seis isoformas del VEGF en seres humanos, las cuales contienen 121, 145, 165, 183, 189 y 206 residuos de aminoácidos, generados como resultado del procesamiento alternativo del RNAm (Ferrara *et al.*, 2003; Partanen y Paavonen, 2001). Las isoformas difieren tanto en su masa molecular como en sus propiedades biológicas. Las distintas isoformas del VEGF-A incrementan la permeabilidad vascular, estimulan la proliferación y migración de las células endoteliales, proveen a dichas células con señales de supervivencia y anti-senescencia, además de promover neuroprotección en desordenes isquémicos (Dvorak, 2005). El VEGF-A165 es la isoforma predominante del VEGF-A. Es una molécula cargada positivamente que se une a la heparina, mientras que el VEGF-A145 y el VEGF-A183 son las variantes menos frecuentes. En los animales, incluyendo a los ovinos, todas las proteínas producto de las isoformas de VEGF tienen un aminoácido menos (Rosales y Guzmán, 2011).

Las propiedades de las distintas isoformas del VEGF-A difieren entre sí. El VEGF-A165 es la isoforma mas común y estudiada, además de ser el

transductor de señales más fuerte entre los distintos tipos del VEGF y fue originalmente descubierto como un potente factor de permeabilización vascular (Dvorak, 2005). Esta isoforma es principalmente secretada, sin embargo, una fracción significativa permanece unida a la superficie celular y a la matriz extracelular. El VEGF-A189 es una proteína unida a la matriz extracelular que se une a la heparina con mayor fuerza que el VEGF-A165 y funciona en la atracción celular en un rango de acción corto. Finalmente, la isoforma 206 se encuentra casi completamente secuestrada en la matriz extracelular y su función se desconoce hasta el momento (Ferrara *et al.*, 2003; Dvorak, 2005).

Se han identificado en los ovinos, mediante la técnica de PCR, algunas de las isoformas como la 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 la placenta humana se ha demostrado la localización del VEGF en las vellosidades del trofoblasto y de macrófagos tanto maternos como fetales, mientras que en estudios *in vitro* el trofoblasto ha secretado VEGF (Ahmed *et al.*, 2000).

El RNAm de VEGF de borregas gestantes se expresa fuertemente 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). La expresión del RNAm de VEGF se va incrementando progresivamente hasta llegar a sus más altos niveles aproximadamente al día 110 de gestación, para posteriormente reducir sus niveles hasta llegar a niveles basales para el día del parto, variaciones que 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 expresión del VEGF está regulada por diferentes factores, como la hipoxia, el óxido nítrico, citocinas y diferentes hormonas. El aporte reducido de O₂ en los tejidos supone un estímulo para la liberación de los factores angiogénicos como el VEGF y éste se correlaciona con el estímulo de la angiogénesis *in*

vivo. Algunas citoquinas o factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante (TGF), la Interleucina-1 (IL-1) y la Interleucina-6 (IL-6), inducen un aumento del VEGF en diferentes líneas 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 adrenocorticotrópica (ACTH), las gonadotropinas y los esteroides sexuales (Ferrara y Davis, 1997; Ferrara, 2004).

Factor de Crecimiento Placentario-1 (PlGF-1).

Otro factor de crecimiento vascular endotelial que favorece la angiogénesis placentaria durante el último tercio de la gestación, es el PlGF-1 (Malamitsi *et al.*, 2005; Skromne-Kadlubik *et al.*, 2009a; Skromne-Kadlubik *et al.*, 2009b).

El factor de crecimiento placentario, es una proteína dimérica identificada hace 20 años, siendo su estructura hasta un 53% homóloga a la de VEGF (Malamitsi *et al.*, 2005).

Tras el corte y empalme del ARNm, se obtienen cuatro isoformas diferentes, PlGF-131, PlGF-152, PlGF-203 y PlGF-224, también referidos como PlGF-1, PlGF-2, PlGF-3 y PlGF-4, que varían en términos del número de aminoácidos, en sus propiedades de secreción y en su afinidad a sitios de unión. La principal diferencia entre estas isoformas es que PlGF-1 y PlGF-3 no poseen dominios que puedan ligarse a la heparina, mientras que PlGF-2 y PlGF-4 poseen varios dominios para ligarse a ésta (Yang *et al.*, 2003; Errico *et al.*, 2004; De Falco, 2012).

El gen de PlGF-1 es altamente expresado en todas las etapas de la gestación, aunque aumenta la cantidad de PlGF-1 hacia el desarrollo final de la placenta (Khaliq *et al.*, 1996; Persico *et al.*, 1999). Se han observado tanto la proteína PlGF-1 como su ARNm en la bicapa trofoblástica, así como en las vellosidades

del mesénquima y en células endoteliales de la vena umbilical, siendo en ésta última altamente expresado. El RNAm de PIGF-1 ha sido detectado en otros órganos incluyendo el corazón, pulmón, músculo esquelético, tiroides y tejido adiposo (Persico *et al.*, 1999; Voros *et al.*, 2005).

El PIGF-1 ha sido identificado en tejidos placentarios de 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).

El PIGF-1 es expresado durante la etapa temprana del desarrollo. Este factor es abundante en las células gigantes del trofoblasto de los roedores, las cuales se encuentran 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). La expresión de PIGF-1 se ha observado en otros tejidos en situaciones patológicas, tendiendo a ser expresado en tumores; el RNAm de PIGF-1 se expresa en los carcinomas de las células renales, en melanomas metastásicos y en meningiomas vascularizados (Torry *et al.*, 2003).

El PIGF-1 se considera como la forma principal de la proteína y su actividad es mediada a través del receptor VEGF-1 (Ribatti, 2008). El PIGF-1 contribuye a la angiogénesis por diferentes mecanismos, en primer lugar, actúa directamente sobre las células endoteliales a través de VEGFR-1, lo cual puede conducir a VEGF para unirse y activar VEGFR-2 y estimular la sensibilidad de la célula a VEGF. En segundo lugar, PIGF-1 toma parte en la angiogénesis, ya que recluta monocitos y macrófagos que desempeñan un importante papel en el crecimiento de los vasos sanguíneos, movilizándolo además a las células hematopoyéticas progenitoras de la médula ósea (Ribatti, 2008).

La explicación del papel directo de PIGF-1 en la promoción de la angiogénesis es complicada porque las diferentes isoformas de PIGF se unen a diferentes

receptores con diferentes afinidades, y se forman fácilmente homodímeros con ellos mismos y heterodímeros con VEGF (Torry *et al.*, 2003).

A pesar de esta especificidad del PIGF por el VEGF-R1, se piensa que el PIGF-1 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. Otros estudios han demostrado que los homodímeros de PIGF pueden unirse a VEGF-R1 pero no a VEGF-R2 (KDR o Flk-1), mientras heterodímeros VEGF / PIGF se unen y activan VEGF-R2 (KDR) (Park *et al.*, 1994; Malamitsi *et al.*, 2005; De Falco, 2012).

El PIGF-1 no tiene ningún efecto por sí solo, pero potencializa la acción de VEGF en las células endoteliales microvasculares (Park *et al.*, 1994). Estos efectos diferentes se pueden explicar por el hecho de que PIGF-1 se une a VEGF-R1 (Flt-1), pero no a VEGF-R2 (KDR) (Park *et al.*, 1994). En ratones, su ausencia no compromete el desarrollo embrionario e incluso las crías nacen saludables y fértiles (De Falco, 2012). Sin embargo, en ratones adultos el knock-out del gen 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).

Los estudios *in vitro* sobre la membrana corioalantoidea de pollo han demostrado que la unión de VEGF tanto a VEGF-R1 (Flt-1) como VEGF-R2 (KDR) media la ramificación de la angiogénesis, mientras que la unión de PIGF a VEGF-R1 (Flt-1) sola, no resulta en la ramificación de la angiogénesis (Ahmed *et al.*, 2000).

Algunas investigaciones, sugieren que VEGF y VEGF-R2 están involucrados en los dos primeros trimestres de la gestación en el establecimiento de los lechos capilares ramificados, mientras que PIGF-1 y VEGF-R1 están más relacionados con finalizar la formación y la maduración capilar en el último trimestre (Kaufmann *et al.*, 1985; Leiser *et al.*, 1985, Ahmed *et al.*, 2000).

Estudios recientes han demostrado que la administración del factor de crecimiento placentario tipo 1 (PlGF-1), durante la gestación de fetos humanos que presentan restricción del crecimiento intrauterino, incrementa el flujo sanguíneo de la placenta y con ello, se favorece significativamente el desarrollo fetal y el peso al nacimiento (Skromne-Kadlubik *et al.*, 2009).

Relaciones entre los factores de crecimiento placentarios y sus receptores

El proceso de señalización que resulta en la angiogénesis se encuentra mediado por uniones de alta afinidad de los Factores de Crecimiento del Endotelio Vascular con receptores específicos de actividad tirosina cinasa, localizados tanto en la superficie de las células endoteliales vasculares, en células derivadas de la médula ósea (Ferrara *et al.*, 2003), así como en forma soluble en la circulación (Veikkola *et al.*, 2000; Shibuya, 2001; Dvorak, 2005). Estos son VEGF-R1 ó Flt-1 (*fms-like tyrosine kinase*), VEGF-R2 o Flk-1 (*fetal liver kinase-1*) o KDR (*de kinase domain receptor*) y VEGF-R3 o Flt-3, y en sus formas solubles que son el sVEGF-R1 y el sVEGF-R2.

Estos receptores contienen siete dominios homólogos a inmunoglobulina (Ig) en su parte extracelular, una región transmembranal, un dominio yuxtamembranal y un dominio intracelular de señalización tirosina cinasa con una interrupción de un inserto de cinasa de 69 aminoácidos y la región carboxi-terminal (Veikkola *et al.*, 2000; Ferrara *et al.*, 2003).

El VEGF-R1 es una glicoproteína transmembranal de 180 kDa y fue el primer receptor de VEGF descrito (de Vries *et al.*, 1992). El VEGF-R1 de superficie celular se une a VEGF-A, VEGF-B, PlGF-1 y a PlGF-2 (Dvorak, 2005), resultando en la activación de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y de otras proteínas de transducción de señales (Maru *et al.*, 1998). Sin embargo, también se ha reportado que por la vía selectiva del Flt-1, el VEGF es incapaz de generar una señal mitogénica (Gille *et al.*, 2001).

El VEGF se une al VEGF-R1 con una constante de disociación (Kd) de 10-20 pM, por lo que se considera que el factor tiene una alta afinidad para este receptor en comparación con el VEGF-R2, con el que tiene una Kd de 75 a 125 pM. El que la capacidad de autofosforilación de VEGF-R2 sea al menos 10 veces mayor que la del VEGF-R1, indica que el VEGF-R2 tiene una mayor capacidad en la traducción de la señal de VEGF. También se considera que VEGF-R2 es el mayor mediador de los efectos mitogénicos, angiogénicos y de permeabilidad de VEGF (Rosales y Guzmán, 2011). Sin embargo, VEGF-R1 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). Además, VEGF-R1 regula las señales de la permeabilidad vascular con la inflamación, y estimula el crecimiento tumoral y metástasis (Shibuya, 2006).

El VEGFR-1 se expresa en células endoteliales y pericitos, así como los en monocitos/macrófagos, osteoblastos, trofoblasto placentario, células mesangiales renales y también en algunas células hematopoyéticas. VEGF-R1 se ha observado en la placenta y en las células del músculo liso uterino. La expresión de VEGF-R1 se incrementa en los sitios de la angiogénesis. A diferencia de VEGF-R2 y VEGF-R3, la hipoxia regula el gen del VEGF-R1 y está mediada por mecanismo dependiente de HIF-1 (Gerber *et al.*, 1997).

El VEGF-R2 fue el segundo receptor del VEGF en ser identificado. Es una proteína de 230 KDa (Veikkola *et al.*, 2000). Este receptor se une a VEGF-A VEGF-C y -D (Dvorak, 2005). Únicamente la forma glicosilada final del VEGF-R2 es capaz de autofosforilarse en respuesta al VEGF (Partanen y Paavonen, 2001) y participa de manera crucial en la angiogénesis en el desarrollo y en la hematopoyesis, siendo el mayor mediador de los efectos mitogénicos, angiogénicos y de aumento de la permeabilidad del VEGF. Además, cuando es activado por el VEGF, resulta en una respuesta migratoria celular (Gille *et al.*, 2001; Partanen y Paavonen, 2001; Ferrara *et al.*, 2003).

En la gestación ovina se demostró que la expresión del RNAm para ambos receptores mantiene un patrón de secreción muy diferente en las carúnculas y en los 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 VEGF-R2 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).

En humanos se ha descrito que VEGF-C y el VEGF-D también se unen a VEGF-R3, que es una proteína de aproximadamente 195 kDa, durante la embriogénesis VEGF-R3 se expresa tanto en los endotelios venosos y linfáticos, pero en los adultos se restringe a los vasos linfáticos y algunas vénulas endoteliales apoyando la idea de su origen linfático (Tammela *et al.*, 2005).

El VEGF-R3 se expresa también en el sincitiotrofoblasto de la placenta humana (Dunk y Ahmed, 2001; Tammela *et al.*, 2005). En ratones, la falta de VEGF-R3 provoca muerte intrauterina debido a un fallo cardiovascular (Dumont *et al.*, 1998). Rahimi *et al.*, (2000) demostraron que mientras VEGF-R2 se requiere para la migración y proliferación de las células endoteliales, durante la angiogénesis el VEGF-R1 puede favorecer también una excesiva proliferación de células endoteliales en competencia con el VEGF-R2.

Receptores Solubles

Los receptores solubles sVEGF-R1 o sFlt-1 y sVEGF-R2 o sFlk-1, son producidos por el corte y empalme alternativos de los receptores de membrana, los cuales carecen de dominios transmembranales y citoplasmáticos, y 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, están conformados por 6 dominios parecidos a inmunoglobinas que conforman la región extracelular, la cual está directamente involucrada con la interacción con el VEGF (Méndez, 2010).

El receptor soluble sVEGFR- 1 actúa como un inhibidor natural de VEGF y PlGF-1 de dos maneras diferentes: en primer lugar, mediante la unión a VEGF la biodisponibilidad de VEGF para VEGFR-2 se reduce, lo que resulta en una disminución de la unión y la señalización a través de su principal ruta angiogénica (Kendall y Thomas, 1993). Sin embargo, el receptor soluble-2 (sFlk-1) antagoniza a VEGF pero no al PlGF-1. En ratas gestantes no fue suficiente la sobreexpresión de sFlk-1 para desarrollar cambios indicadores de preeclampsia, posiblemente debido a que se requiere el antagonismo hacia ambos, VEGF y PlGF, para reproducir la enfermedad (Espinoza, 2011).

El sFlt-1 fue identificado inicialmente como un factor soluble que potencialmente media la disfunción endotelial materna, mediante la expresión del gen del tejido placentario entre una mujer con o sin preeclampsia. Así, empleando chips de micro-ordenación, se encontró que el RNA mensajero de sFlt-1 dramáticamente aumentaba en las placentas de preeclámpticas (Maynard *et al.*, 2003). Tanto VEGF como sVEGFR-1 son altamente expresados en la placenta durante la gestación (Clark *et al.*, 1996; Vuorela *et al.*, 2000). En humanos, el receptor soluble sVEGFR-1 se libera en un principio del trofoblasto placentarios hacia la circulación materna, siendo detectado a partir de los 30 días después de la concepción (Molskness *et al.*, 2004).

El sVEGFR-1 se incrementa al menos 20 veces en la circulación materna durante el último tercio de gestación. El primer día después del parto, el VEGF libre puede ser detectados nuevamente en la circulación materna, lo que sugiere que sVEGFR-1 desaparece en ausencia de la placenta (Wikstrom *et al.*, 2007). Durante el primer trimestre de la gestación, la expresión placentaria de la proteína de sVEGFR-1 ha sido localizada en el sincitiotrofoblasto y las células de Hofbauer, en el estroma decidual, en el trofoblasto extraveloso, en macrófagos y en células epiteliales glandulares (Clark *et al.*, 1996; Shiraishi *et al.*, 1996; Vuorela *et al.*, 2000). La placenta produce VEGF y sVEGFR-1 en la circulación tanto fetal como materna, pero la producción es mucho más abundante en el lado materno (Brownbill *et al.*, 2007). En un modelo de investigación con ratas gestantes, se demostró que la administración de sVEGFR-1 en la circulación causaba hipertensión y proteinuria y el exceso de sVEGFR-1 fue acompañado también de una disminución en las concentraciones de VEGF y PlGF, hallazgo que condujo a la suposición de que elevados niveles circulantes del sVEGFR-1, se asocian con el desarrollo de los signos clínicos de preeclampsia (Maynard *et al.*, 2003).

Las concentraciones elevadas de sVEGFR-1 también se asocia al retraso en el crecimiento intrauterino (Shibata *et al.*, 2005; Chaiworapongsa *et al.*, 2008). Sin embargo, el aumento en las concentraciones de sVEGFR-1 en la circulación materna es menor que en el caso de la preeclampsia (Savvidou *et al.*, 2006).

Relación de la hipoxia con algunos factores de crecimiento vasculares endoteliales

La oxigenación puede ser el mayor regulador entre el balance de la expresión de VEGF y PlGF-1 en la gestación, así como de la expresión de sus receptores (Shweiki *et al.*, 1992). La hipoxia estimula la expresión de proteínas de choque de calor (heat shock proteins) y proteínas reguladas por la glucosa. Estas proteínas son, por ejemplo, la endotelina, los factores de crecimiento vascular endotelial (VEGF), así como la Interleucina-1 α (IL-1 α). También se ha

demostrado que la hipoxia puede inducir la expresión de los ARN mensajeros del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y del VEGF, en cultivo de tejidos, indicando que el oxígeno es un potente regulador de diferentes pasos de la angiogénesis (Kourembanas *et al.*, 1991; Bdoлах *et al.*, 2005).

La familia de el factor inducible de la hipoxia (HIF) está compuesta por tres α subunidades HIF1A, HIF2A, y HIF3 y tres β subunidades HIF1B/ARNT, HIF2B/ARNT2 y HIF3B /ARNT3. HIF1A fue descubierta inicialmente por la identificación de un Elemento de Respuesta a Hipoxia (HRE). La proteína heterodimérica que se une al HRE consiste en una subunidad α inducible y una β subunidad constitutivamente expresada. En muchos tejidos y tipos de células, HIF1A está regulado en respuesta a la hipoxia y provoca múltiples respuestas fisiológicas, incluyendo la eritropoyesis y la glucólisis para contrarrestar la deficiencia de oxígeno inmediata y para estimular la angiogénesis como solución a largo plazo para la hipoxia. HIF1A, HIF2A se expresa predominantemente en tejidos muy vascularizados como el corazón, los pulmones y la placenta (Song W *et al.*, 2008).

Diferentes estudios han identificado que la progesterona induce la expresión de HIF1A y que el interferón tau estimula a HIF1A, lo que a su vez favorece la expresión del factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) en el endometrio y en el trofoectodermo del embrión (Song W *et al.*, 2008; Bazer *et al.*, 2008). Sin embargo, la región potencializadora de PIGF no demostró la presencia de alguna secuencia del gen HRE, como si se observó para VEGF-A y VEGF-R1. Sin embargo, esta región de PIGF presentó varias secuencias de reconocimiento para los Factores de 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- κ B). Mientras que en algunos estudios se considera que a diferencia del VEGF-A, el PIGF no es inducible por hipoxia, otros han reportado que tanto la hipoxia como la hiperoxia pueden regular positivamente la expresión del PIGF durante la angiogénesis (Khaliq *et al.*, 1999). La

sobreexpresión de HIF-1 en las células endoteliales o en células cardíacas también influye positivamente en la expresión de PlGF (Yamakawa *et al.*, 2003; De Falco, 2012).

A diferencia de VEGFR-2 y VEGFR-3, la hipoxia regula el VEGFR-1, el cual está mediado por HIF-1. Al respecto, Gerber *et al* (1997) encontraron una región promotora de Flt-1 que incluía una secuencia que se aparejaba con el sitio de unión de consenso del HIF, y que anteriormente fuera encontrado en otros genes inducidos por la hipoxia, tales como los genes de VEGF y eritropoyetina.

Se ha demostrado que la disminución del porcentaje de oxígeno a 20%, 8% y 2% en un cultivo primario de citotrofoblasto, causó un aumento en la concentración de Flt-1 y el sFlt-1 ARNm estaba marcadamente aumentado. Aunque los niveles de VEGF en estas células aumentaba modestamente con la hipoxia, las concentraciones de VEGF libres no eran detectables junto con las concentraciones bajas libres de PlGF en el medio, en presencia de concentraciones estables de ARNm de PlGF (Nagamatsu *et al.*, 2004).

Rajakumar y Conrad (2000) investigaron la expresión del HIF en placentas humanas normales y encontraron que el ARN mensajero de HIF-1 α y 2 α se presentaba en la placenta de todas las edades de gestación. Ambos se expresaban en el sincitiotrofoblasto, el citotrofoblasto de las vellosidades y en la vasculatura fetoplacentaria.

También se ha sugerido que la tensión de oxígeno puede también regular la habilidad del citotrofoblasto para diferenciarse y como consecuencia, expresar proteínas que son importantes para la invasión placentaria (Genbacev *et al.*, 1997).

Modo de acción de algunos vasodilatadores desarrollados para tratar la disfunción eréctil

Tadalafil y Sildenafil.

En la actualidad, no existe suficiente información acerca del uso de tadalafil en IUGR, ya que la mayor parte de estas investigaciones se basan en el uso de Sildenafil Citrato. Aunque su mecanismo de acción es idéntico, ambos tienen características bioquímicas y farmacocinética distintas. Estas diferencias potencialmente pueden afectar a la dosis requerida, al régimen de dosificación, y a la vía de administración, entre otros aspectos.

El Tadalafil, cuyo uno de sus nombres comerciales es **Cialis**, de el laboratorio (ELI LILLY NEDERLAND B.V), es un fármaco utilizado para tratar la disfunción eréctil (DE). El Tadalafil es un fármaco inhibidor de la enzima PDE-5 (fosfodiesterasa tipo 5 encargada de inactivar al GMP cíclico, el cual es sintetizado a través del vasodilatador llamado óxido nítrico (ON).

El Sildenafil, uno de cuyos nombres comerciales es *Viagra*, es un fármaco que ha sido recientemente probado para el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar, y también se ha estado experimentando su eficiencia en el crecimiento intrauterino restringido (Miller, 2009). Si bien estos estudios se han realizado con citrato de Sildenafil (Viagra), éste posee el mismo mecanismo de acción que el tadalafil (Miller, 2009).

La erección del pene durante la estimulación sexual es causada por el aumento del flujo sanguíneo como consecuencia de la relajación de las arterias del pene y del músculo liso del cuerpo cavernoso. Esta respuesta está mediada por la liberación de ON de las terminaciones nerviosas y las células endoteliales, que estimulan la síntesis de GMPc en las células de músculo liso. Entonces, el GMP cíclico relaja el músculo liso y aumenta el flujo de sangre al cuerpo cavernoso (De Tejada *et al.*, 2002; Rojo *et al.*, 2003).

Mientras que en una gestación es el trofoblasto el que produce cantidades elevadas de ON, el cuál es muy importante en la vasodilatación de la circulación feto-placentaria, ya que mejora el aporte de oxígeno y el suministro de nutrientes hacia el feto (Ogando *et al.*, 2003).

Estudios *in vitro* han mostrado que el Tadalafil es un inhibidor selectivo de la Fosfodiesterasa tipo 5 (PDE5), enzima que se encuentra en el músculo liso de los cuerpos cavernosos del pene, en el músculo liso vascular, en el músculo esquelético y también en plaquetas, riñón, pulmón y cerebelo. La inhibición de PDE5 mejora la vasodilatación, al aumentar la cantidad de GMPc. La selectividad del Tadalafil para inhibir la PDE5 es más de 10.000 veces superior frente a su acción inhibitoria de la PDE1, laPDE2, y la PDE4 (enzimas que se encuentran en el corazón, cerebro, vasos sanguíneos, hígado y otros órganos). Además, la selectividad del Tadalafil también supera en más de 10.000 veces la inhibición de la PDE5 frente a la PDE3, enzima que se halla en el corazón y los vasos sanguíneos, y que desempeña un papel importante en la contractilidad cardiaca. Además, el Tadalafil es aproximadamente 700 veces más selectivo para la PDE5 que para la PDE6, otra enzima que se encuentra en la retina, y que es responsable de la fototransducción. También el Tadalafil presenta una selectividad superior más de 10.000 veces para la PDE5 frente a la PDE7, PDE8, PDE9 y PDE10.

El Tadalafil se absorbe por vía oral y la concentración plasmática máxima media (Cmax) se alcanza a las 4 h tras su dosificación. Posteriormente, la concentración plasmática decrece gradualmente, con una vida media de alrededor de 16 h, lo que hace posible su posología como monodosis diaria (Navarro y Bendito, 2011). Aunque el citrato de Sildenafil (Viagra), el Vardenafil (Levitra) y el Tadalafil (Cialis) inhiben la PDE5, la característica farmacológica distintiva del Tadalafilo es su vida media más larga (17.5 horas) en comparación con Viagra (4.0-5.0 horas) y Levitra (4.0-5.0 horas), resultando en mayor duración de acción (María de Jesús *et al.*, 2006).

El Tadalafil es metabolizado principalmente por la isoforma 3A4 del citocromo CYP450 y el metabolito principal circulante es el metilcatecol glucurónido. Este metabolito es al menos 13.000 veces menos selectivo que tadalafil para la PDE5, por consiguiente, no se espera que sea clínicamente activo a las concentraciones de metabolito observadas, mientras que su vida media plasmática es de alrededor de 17.5 horas en individuos sanos. El Tadalafil se excreta predominantemente en forma de metabolitos inactivos, principalmente en heces (aproximadamente el 61 % de la dosis administrada) y en menor medida en la orina (aproximadamente el 36 % de la dosis) (Gaudo y Navarro, 2011).

En estudios *in vivo* en los cuales se administró citrato de Sildenafil (SC) a ovejas y ratas gestantes se demostraron efectos sobre la hemodinámica y el peso fetal. Una amplia revisión sobre el tema destaca que el SC produce un incremento del flujo uterino en ovejas y además actúa como agente tocolítico, ya que produce relajación muscular al reducir la presión intrauterina en ratas (Villanueva-García *et al.*, 2007).

Recientemente se publicó un estudio donde la administración de SC no mejoró la perfusión uterina, aunque la administración se realizó de forma aguda sobre un modelo animal de IUGR producido por la ligadura de la arteria umbilical lo que dio lugar a una situación muy rápida de isquemia aguda seguida de la administración de SC (Miller *et al.*, 2009).

Dentro de los efectos que SC produce en los fetos de ratas y ovinos, destaca el aumento del peso fetal tras administrarlo (Belik *et al.*, 2005).

En animales gestantes se han llevado a cabo múltiples estudios sobre la seguridad de su administración. Éstos han concluido que no existe un efecto fetotóxico o teratogénico al administrarlo a dosis elevadas (200mg/Kg) de forma diaria durante la fase de organogénesis. Además, crías de ratas que recibieron SC durante su gestación y hasta el final de la lactancia no presentaron

problemas teratogénicos o potencial carcinogénico, ni en la edad adulta, presentaron efectos adversos sobre la fertilidad (Abbot *et al.*, 2004).

Fosfodiesterasas (PDE)

Las fosfodiesterasas de los nucleótidos cíclicos (PDE) son metalohidrolasas que hidrolizan los nucleótidos cíclicos a sus correspondientes 5'-nucleosidos monofosfato en presencia de cationes divalentes. Estas enzimas pueden ser específicas de AMPc, GMPc o bien utilizar ambos sustratos.

La actividad de las PDE fue descrita poco después del descubrimiento del AMPc por Rall y Sutherland en 1958, y fue pieza fundamental para apoyar la importancia de estos nucleótidos como moléculas fisiológicamente relevantes. Dentro de la superfamilia de las PDE, existen tres clases: la clase I que contiene todas las PDE de los mamíferos, la clase II que se ha encontrado en bacterias, levaduras y hongos, y la clase III que únicamente está presente en las bacterias (Ritcher, 2002).

Las once familias de PDE (PDE1-PDE11) que conforman esta superfamilia han sido clasificadas con base en su secuencia de aminoácidos, sus propiedades bioquímicas, sensibilidad a inhibidores, mecanismos reguladores y por su afinidad a AMPc o GMPc. Aunque los miembros de la familia de las PDE presentan propiedades diferentes, todas ellas comparten una estructura muy similar que puede dividirse en tres dominios: un extremo amino (NH₂), una región conservada o dominio catalítico y un extremo carboxilo (COOH).

En general, hay una homología de aproximadamente el 65% al comparar la secuencia de aminoácidos entre miembros de una misma familia, mientras que disminuye a menos de un 40% al comparar miembros de diferentes familias (Beavo, 1995). Una de las principales características que presentan la mayoría de las PDE es que a partir de un único gen se obtienen diferentes isoformas, generadas por el empalme alternativo del ARNm. Al elevado número de genes

clonados y a la posibilidad de ser procesadas por el empalme alternativo, se ha encontrado que los nucleótidos cíclicos pueden ser degradados por un gran número de isoformas de PDE. Se han identificado más de 20 genes de PDE y se estima que hay más de de 50 enzimas diferentes (Lugnier, 2006). También se considera que existe la posibilidad de que algunas de las PDE se expresen en algunas especies y no en otras (Yuasa *et al.*, 2000).

Una de las formas de clasificar a las once familias de las PDE se basa en el grado de afinidad por el gran número de inhibidores de éstas descritos, los cuales se han dividido en dos tipos: los de primera generación que incluye a las metilxantinas (cafeína, teophila, IBMX o papaverina), las cuales son inhibidores no selectivos con efectos secundarios; y los de la segunda generación, que son los que tienen mayor afinidad y selectividad por las diferentes familias, dentro de los cuales encontramos a los inhibidores de la PDE5 (Sildanefil, Vardenafil y Tadalafil) o de la PDE4, y que también han sido utilizados en enfermedades respiratorias como el asma (Huang *et al.*, 2001).

La familia de PDE5 se caracteriza por presentar una elevada especificidad al GMPc (km 1-5 μ M) y por contener sitios de unión de alta afinidad para este nucleótido. Dicha familia consta de un único gen, el PDE5A, y de tres variantes por corte y empalme: la PDE5A1 y la PDE5A2 aisladas de pulmón bovino, y la PDE5A3 aislada de tejido cavernoso de pene (Loughney *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 2000).

La PDE5 está considerada como una proteína citosólica y los niveles más altos de la expresión de su ARNm en roedores se han detectado en el riñón, el páncreas, el corazón y el pulmón (Kotera *et al.*, 2000). También se ha detectado el ARNm en la musculatura vascular lisa y la esquelética, la placenta, el hígado y tejidos gastrointestinales (Loughney *et a.*, 1998 Stacey *et al.*, 1998). Los mensajeros de la PDE5A1 y LA PDE5A2 se encuentran en una gran variedad de tejidos mientras que la PDE53 está restringida a la musculatura vascular lisa (Kotera *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2000). En los ovinos el

ARNm de la PDE5 se localiza en el miometrio y los placentomas, y la proteína de PDE5 fue inmunolocalizada en los músculos lisos de los vasos maternos, el estroma y en la capsula de la placenta. También se conoce que las hembras gestantes expresan hasta dos veces más la PDE5 que las no gestantes (Coppage *et al.*, 2005).

Óxido Nítrico (ON)

Uno de los principales productos del endotelio es el óxido nítrico, que se encarga de mantener un estado de vasodilatación sistémica. Es el responsable de la disminución de las resistencias periféricas que se observan durante el embarazo normal (Speer, 2008).

El óxido nítrico es uno de los factores claves para la regulación de los cambios adaptativos que ocurren en los vasos sanguíneos uterinos y placentarios durante la preñez (Zhu *et al.*, 2005) y puede participar en la invasión vascular del trofoblasto (Ogando *et al.*, 2003).

Se ha demostrado que la disminución de la síntesis de óxido nítrico después de la aplicación sistémica de N-nitro-L-arginina, un inhibidor de la sintetasa de óxido nítrico, provoca hipertensión y restricción del crecimiento intrauterino en ratas (Yallampalli *et al.*, 1993). Algunos donantes de óxido nítrico, como el trinitrato de glicerilo y el mononitrato de isosorbide pueden producir relajación de la arteria umbilical (Cahuduri *et al.*, 1991; Izumi *et al.*, 1994) y disminución de la presión de perfusión de la circulación placentaria humana *in vitro* (Myatt *et al.*, 1991).

El ON es un gas que se forma en el organismo en los tejidos que contienen la enzima sintetasa de ON (NOS), una enzima oxidativa que se encuentra distribuida en todo el organismo y que actúa sobre el aminoácido L-arginina para formar citrulina y ON en proporción de 1:1. Hasta la actualidad, de dicha enzima se han identificado dos isoformas: una constitutiva (cNOS) y la otra inducible (iNOS); de la cNOS a la vez se identifican dos isoformas, una endotelial (eNOS) que se encuentra principalmente en las células endoteliales de la pared de los vasos sanguíneos, y otra que ha sido denominada neuronal (nNOS) por encontrarse preferentemente en el sistema nervioso central (cerebelo, hipotálamo, cerebro medio e hipocampo), médula y sistema nervioso periférico. Ambas isoformas son dependientes de iones de calcio (Ca^{++}), el cual se une a la calmodulina y el compuesto así formado es su activador (Shizukuda *et al.*, 1999; Vonnahme y Ford, 2003; Zhu *et al.*, 2005; Rivas *et al.*, 2006).

El ON liberado por las células que contienen alguna isoforma de la NOS, en respuesta a diferentes estímulos, migra hacia las células blanco y activa la forma citosólica de la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs), una hemoproteína que es su receptor biológico. Dicha enzima cataliza la síntesis intracelular de GMPc, a partir del guanosin trifosfato (GTP), y que actúa como un segundo mensajero intracelular a través de la protein cinasa (PKG). Esta proteína condiciona la apertura de canales de potasio y actúa como un potente relajante del músculo liso de arteriolas y arterias, por estimulación de la homeostasis del calcio y disminución del contenido intracelular del mismo. Su acción cesa cuando la enzima fosfodiesterasa tipo 5, contenida en las células musculares lisas inactiva al GMPc para producir el cierre de los canales de sodio y agotar la acción relajante. La vida media del ON es muy breve (unos segundos) y a medida que se difunde se combina con rapidez con otros radicales libres y diferentes grupos afines, como la oxihemoglobina. Una vez liberado se descompone para producir dos metabolitos estables, radicales nitrito (NO_2) y nitrato (NO_3), que son los productos finales. La suma de ambos constituye un buen índice de la producción total de ON (Durazo, 2007).

La expresión del factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) activa las enzimas NOS y con esto se libera el ON, el cual potencia la acción del factor angiogénico y de esta manera favorece la viabilidad embrionaria. Se cree que esto puede ocurrir a través del receptor VEGFR-2 (Shizukuda *et al.*, 1999; Vonnahme y Ford, 2003; Zhu *et al.*, 2005; Rivas *et al.*, 2006).

También se ha demostrado que la liberación de NO puede conducir a la relajación del músculo liso, a través de la vía mediada por monofosfato guanosina cíclico (cGMP). La duración de la acción del cGMP está controlada mediante una enzima citosólica, la 5-fosfodiesterasa (5-PDE) (Reyna Villasmil *et al.*, 2008).

Durante el embarazo normal, tanto la excreción urinaria de GMPc como de nitratos y nitritos (metabolitos del ON) está aumentada (Myatt *et al.*, 1991). A pesar de esto, todavía no se ha podido determinar claramente si hay una disminución global de ON en mujeres gestantes con preeclampsia, ya que se ha visto una disminución de sus metabolitos en orina pero, no se ha podido demostrar en plasma (Shaamash *et al.*, 2002).

Estudios *in vitro* realizados sobre biopsias de pequeñas arterias miométriales y omentales de pacientes con IUGR (Wareing *et al.*, 2005; Wareing *et al.*, 2006), ponen de manifiesto que el citrato de sildenafil actúa como un potente vasodilatador, al incrementar y prolongar la acción de GMPc por inhibición selectiva de la fosfodiesterasa tipo 5, enzima que convierte la concentración intracelular de GMPc como segundo mensajero en su forma inactiva.

Algunos Antecedentes de Gestaciones Interespecies.

Las gestaciones entre especies del mismo género se pueden originar cuando existe una cría híbrida en desarrollo, obtenida mediante monta dirigida, inseminación artificial o bien, mediante la transferencia de los embriones híbridos previamente producidos.

Algunas gestaciones interespecies se han llevado a cabo con fines prácticos dada su utilidad para el hombre o de investigación para la conservación de diferentes especies, y de manera más específica, para el estudio de la fisiología reproductiva y de la gestación, incluyendo el análisis de la morfología e histología de la placenta, el 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, al ser comparadas con las gestaciones normales dentro de cualquiera de las diferentes especies que se están hibridando (Gomez, 2013). Además, los híbridos entre diferentes especies 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 que les dan origen (Allen *et al.*, 1993).

Se conoce desde hace tiempo la presencia de cruzas entre especies del mismo o diferente género, como es el caso de la mula, cruce entre burro (*Equus asinus*) y (*Equus caballus*), los cuales tienen números cromosómicos de $2n = 62$ y $2n = 64$ cromosomas respectivamente y que origina una descendencia estéril $2n = 63$ (Delgadillo *et al.*, 2003). También de cruzas híbridas entre ovinos (*Ovis aries*) y caprinos (*Capra hircus*), con un número cromosómico de $2n = 57$ (Mine *et al.*, 2000).

En gestaciones interespecies *Ovis aries* x *Ovis canadensis*, Delgadillo *et al.* (2003) determinaron y compararon por primera vez el número diploide ($2n$) y la morfología cromosómica del producto, dando a conocer que el híbrido de esta cruce es fértil y que el arreglo cromosómico de las dos especies y el híbrido es

igual, ya que todos tienen un número cromosómico de $2n=54$, formado por tres pares de cromosomas submetacéntricos grandes y 23 pares de cromosomas acrocéntricos que varían en tamaño.

Calderón (2008), realizó el seguimiento de las concentraciones de progesterona y describió la morfología e histología placentaria de tres diferentes tipos de gestaciones: una gestación intraespecífica de ovejas domésticas, una gestación intraespecífica de borregos Cimarrón y una gestación interespecífica, producto de la cruce de ovejas domésticas con borregos Cimarrón. En sus resultados encontró mayores concentraciones de progesterona en las gestaciones domésticas a partir de la semana 17, en comparación con la gestación de productos híbridos. También encontró que la longitud de las placentas, su peso y el diámetro de los cotiledones era menor en las placentas de crías híbridas, comparadas con las de las crías de los otros dos grupos. Igualmente observó un menor grosor y vascularización en las placentas de las crías híbridas, además de que las crías híbridas presentaron un menor tamaño y peso en comparación con las crías domésticas y finalmente, a través de microfotografías, observó una menor cantidad de células binucleadas en las gestaciones híbridas en comparación con las de los otros dos grupos.

Otra investigación realizada comparó las concentraciones séricas de progesterona, del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y del factor de crecimiento placentario (PIGF-1) durante gestaciones de ovejas domésticas, así como de gestaciones interespecíficas logradas a partir de la inseminación de ovejas domésticas (*Ovis aries*) con Cimarrón (*Ovis canadensis mexicana*), mostrando que durante toda la gestación intraespecífica de las ovejas domésticas se presentaron concentraciones de progesterona y PIGF-1 superiores a las de las gestaciones híbridas, mientras que 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

(221.5mm²) en comparación con las domésticas (669.7mm²) y al nacimiento, las crías híbridas pesaron menos (2.1±0.1 kg) que las domésticas (4.6±0.2 kg), a pesar de que la duración de la gestación fue mayor en las híbridas (153±0.96 días) que en las domésticas (147±0.89 días) (Gómez, 2013).

En otro estudio también se determinó si la administración de progesterona a lo largo de la gestación de híbridos entre borregas domésticas y Cimarrón favorecía el crecimiento placentario y fetal. Para ello, se transfirieron embriones híbridos (*O. aries* x *O. canadensis*) a receptoras domésticas (*O. aries*). Los niveles de progesterona fueron diferentes entre el grupo tratado con progesterona y el no tratado, en las semanas 7 a 11, 15 a 17 y 19 a 22. El periodo de gestación fue similar ($P>0.05$) entre grupos, 152.60±1.14 días para el grupo tratado y 153.33±2.16 días para el control. En contraste, al compararse el peso al nacimiento, las crías del grupo tratado con progesterona fueron más pesadas (3.41±0.46 kg) que las del control (2.22±0.25 kg). Las placentas en el grupo tratado tuvieron una mayor longitud (71.20±6.79 cm) que las del grupo control (50.83±8.13 cm) pero el ancho fue similar (19.44±2.55 cm y 18.67±1.89 cm, respectivamente). El número de cotiledones no fue diferente entre las placentas del grupo tratado y el control (54.60 y 56.83, respectivamente), pero el peso de los cotiledones en el grupo tratado con progesterona fue mayor (1.70±0.70 g vs 1.34±0.76 g) (Hernández, 2012).

III. JUSTIFICACIÓN

Dado que en el establecimiento de gestaciones entre especies filogenéticamente lejanas, como la generada entre las ovejas domésticas (*Ovis aries*) y los borregos Cimarrón (*Ovis canadensis*), se originan alteraciones en la secreción de hormonas como la Progesterona, el VEGF y el PlGF-1, así como un menor desarrollo de la placenta y el consecuente menor tamaño y peso de las crías al nacimiento, en el presente trabajo se evaluará si la administración de Progesterona y Tadalafil (*Cialis*) pueden favorecer el desarrollo placentario y fetal durante una gestación restringida, lo cual también podría contribuir al

estudio de un problema importante en la salud y el bienestar animal, y con potenciales aplicaciones en el bienestar y la salud humana.

IV. HIPOTESIS

En una gestación entre ovejas domésticas y borregos Cimarrón, las concentraciones séricas de hormonas fundamentales para el adecuado desarrollo de la gestación, como serían la Progesterona (P4), el Factor de Crecimiento Placentario tipo 1 (PIGF-1) y el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) se verán alteradas, resultando en menor desarrollo placentario y fetal, efectos que serán revertidos con la administración exógena de Progesterona y Tadalafil, que favorecerán el desarrollo placentario y el crecimiento intrauterino fetal durante una gestación denominada restringida.

V. OBJETIVOS

Objetivo General

Incrementar el desarrollo placentario y el crecimiento fetal intrauterino en un modelo de gestación restringido, mediante la administración de progesterona y tadalafil.

Objetivos Específicos

- 1.- Producir embriones en ovejas domésticas inseminadas con semen congelado de borrego Cimarrón.
- 2.- Generar gestaciones restringidas a través de la transferencia de embriones híbridos de Cimarrón a ovejas receptoras domésticas.
- 3.- Comparar las concentraciones de progesterona durante la gestación de ovejas con embrión doméstico y de ovejas con embrión híbrido tratadas o no con progesterona y/o tadalafil.

4.- Comparar las concentraciones de VEGF durante las semanas 14 a 20 de la gestación de ovejas con embrión doméstico y de ovejas con embrión híbrido tratadas o no con progesterona y/o tadalafil.

5.- Comparar las concentraciones de PIGF durante las semanas 14 a 20 de la gestación de ovejas con embrión doméstico y de ovejas con embrión híbrido tratadas o no con progesterona y/o tadalafil.

6.- Comparar la morfometría placentaria y el número y tamaño de los cotiledones presentes en placentas obtenidas durante el parto de fetos ovinos domésticos o de fetos híbridos cuyas madres fueron tratadas o no con progesterona y/o tadalafil.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

Localización

El presente trabajo se realizó en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Ovina (CEIEPO) y en el Departamento de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Animales

Se contó con un total de 50 borregas de la raza Suffolk, Dorset y cruzas de Suffolk con Dorset para formar 5 grupos. Cada grupo se conformó aleatoriamente por 10 ovejas y de éstas 2 fueron donadoras y 8 receptoras. Las ovejas tenían un peso vivo de alrededor de 90 kg, entre tres y cuatro años de edad, y dos o tres partos previos. La condición corporal de las hembras en una escala de uno a cinco, fue de 2.5 a 3.0 durante la gestación temprana (dos primeros tercios) y de 3.5 a 4.0 durante la gestación tardía (último tercio).

Producción de embriones

Se utilizaron 10 ovejas domésticas como donadoras de embriones, las cuales fueron sincronizadas con esponjas vaginales de 20 mg de acetato de fluorogestona (FGA) durante trece días. Para la superovulación se administró intramuscularmente una dosis total de 180 mg de hormona folículo estimulante (FSH), que fue administrada en dosis decrecientes cada 12 horas durante cuatro días, iniciando dos días antes del retiro del progestágeno (Cervantes *et al.*, 2007). Cuatro grupos de ovejas superovuladas fueron inseminados intrauterinamente con semen congelado de borrego Cimarrón (*ovis canadensis*), y un grupo fue inseminado con semen de borrego doméstico (*ovis aries*) 44 horas después de retirado el progestágeno. La inseminación ultrauterina se realizó por vía laparoscópica. Para ello, las ovejas permanecieron sin agua y sin alimento durante 48 horas antes de ser anestesiadas con 0.44 mg/kg de xilacina al 10% y 1 mg/kg de ketamina. Una vez anestesiadas se esquiló y lavó la región abdominal con jabón quirúrgico y benzal, y se colocaron en una mesa para inseminación en decúbito dorsal y se introdujo una aguja de Veress para insuflar la cavidad abdominal. Se realizaron dos incisiones a 3 cm por debajo de la ubre y a cada lado de la línea media y se insertaron dos trócares con cánula de 5 mm de diámetro. Por uno de los trócares se introdujo un telescopio recto de 5 mm de diámetro y por el otro el aplicador para semen, y se inseminó cada uno de los cuernos uterinos con dos dosis de semen congelado de borrego Cimarrón con una concentración de 70×10^6 de espermatozoides (Figura 1). Finalizada la inseminación se retiraron las cánulas, se suturaron las incisiones y se administraron 40,000 UI/kg de peso de vivo de penicilina de larga acción como antibiótico y 2.2 mg/kg de peso vivo de meglumina de flunixin como analgésico (Ortiz *et al.*, 2011).



Figura 1. Inseminación artificial empleando semen congelado de borrego cimarrón

Recolección de embriones

Se llevó a cabo mediante laparotomía medio ventral el día siete posterior a la inseminación artificial, para lo cual las hembras se sometieron a anestesia con 0.44 mg/kg de xilacina al 10% y 1 mg/kg de ketamina. Una vez anestesiadas se rasuraron, se lavó y desinfectó la región abdominal, para realizar una incisión de 4 cm de largo y 2 cm anterior a la ubre sobre la línea media para entrar a la cavidad abdominal. Antes de exteriorizar los cuernos uterinos se evaluó la respuesta a la superovulación mediante la revisión de los ovarios, contando el número de cuerpos lúteos y su calidad. Si la hembra respondió a la superovulación se exteriorizó su útero y se lavó cada cuerno del útero utilizando una sonda de Foley (calibre 10 Fr) que se introdujo en la base mediante una punción realizada con un catéter intravenoso (14G x 5½) para recuperar el medio de lavado (Vigro Complete Flush Solution, AB Technology,USA). A través de otro catéter intravenoso (18G x 1¼) insertado en la punta del cuerno uterino. Se administraron 60 ml del medio, que se colectó en un filtro concentrador. Concluida la recolección de los embriones el útero se regresó a la cavidad abdominal y se suturó la incisión. Los embriones fueron

conservados en una solución de mantenimiento (Vigro Holding Plus, AB Technology, USA).

Los embriones fueron conservados en una solución de mantenimiento y evaluados morfológicamente en un microscopio estereoscópico, clasificándolos de acuerdo a su grado de desarrollo y calidad (cuadro 1 y cuadro 2) en ovocitos, mórulas o blastocistos transferibles o no transferibles (Cervantes *et al.*, 2007).

Cuadro 1. Clasificación de los embriones por grado de desarrollo

CATEGORÍA	GRADO DE DESARROLLO
1	Ovocito (sin fertilizar)
2	2 a 12 células
3	Mórula temprana
4	Mórula (compacta)
5	Bastocisto inicial
6	Blastocisto (maduro)
7	Blastocisto expandido
8	Blastocisto expandido maduro

Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones
(International Embryo Transfer Society, IETS)

Cuadro 2. Clasificación de los embriones por calidad

CÓDIGO	CALIDAD
1	Excelente
2	Bueno
3	Regular (pobre)
4	Degenerado (muerto)

Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones
(International Embryo Transfer Society, IETS)

Transferencia de embriones híbridos de Cimarrón a receptoras domésticas.

Los embriones recolectados se transfirieron individualmente a sus respectivas receptoras, lo que permitió controlar el que cada oveja geste sólo un producto. Las ovejas domésticas receptoras de embriones se sincronizaron mediante esponjas vaginales con 20 mg de acetato de fluorogestona durante 13 días y a su retiro se administraron 300 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG, Folligón Intervet, Francia). Para la transferencia de los embriones las receptoras se mantuvieron a dieta por 48 horas y fueron anestesiadas con 0.44mg/kg de xilacina intramuscular y 1.0mg/kg de peso vivo de ketamina endovenosa. La transferencia se realizó con la ayuda de un endoscopio para exteriorizar el cuerno uterino ipsilateral al ovario que presentaba el cuerpo lúteo de mejor calidad (Figura 2). En el cuerno seleccionado se realizó una pequeña punción y se introdujo el embrión previamente cargado en un catéter. Los embriones que se transfirieron fueron mórulas y blastocistos de calidad 1 (excelente). Una vez finalizada la transferencia, se suturaron las incisiones y se administró intramuscularmente 2 mg/kg de peso de meglumina de flunixin y 20,000 UI/kg de peso de penicilina G procaínica y estreptomicina. La administración de antibiótico continuó por cinco días más. Horas después de realizada la transferencia, se les proporcionó agua y pastura en pequeñas cantidades y al día siguiente la alimentación regular (Cervantes *et al.*, 2007; Ortiz *et al.*, 2011).

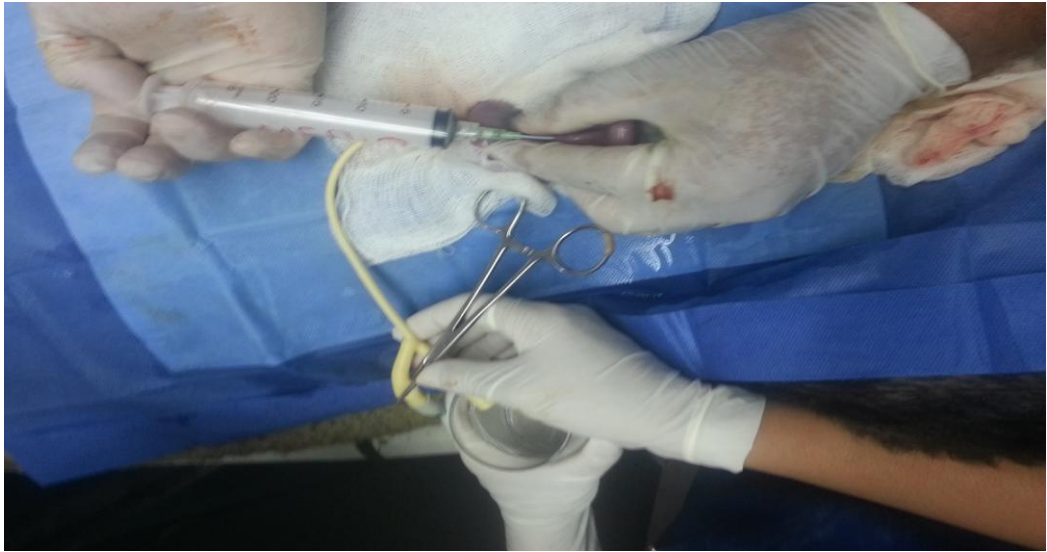


Figura 2. Recolección de embriones por laparotomía medio ventral

Diagnóstico de Gestación

Entre los días 15 a 19 posterior a la inseminación artificial, se verificó el no retorno al estro, utilizando machos enteros cubiertos con un mandil.

A las borregas que no retornaron a estro, se les practicó al día 37 post inseminación, una ultrasonografía de imagen, utilizando un transductor lineal de 7.5 Mhz y 40 mm de longitud que se introdujo rectalmente para verificar la presencia de vesículas embrionarias, el latido cardiaco del feto en formación y desarrollo de los placentomas (Figura 3).



Figura 3. Diagnóstico de gestación por ultrasonografía.

Tratamiento con progesterona (P4) y tadalafil (*Cialis*) para favorecer el crecimiento placentario y fetal.

Una vez diagnosticadas como gestantes las borregas fueron divididas aleatoriamente en 5 grupos; el grupo 1 (n=5, embrión doméstico) sirvió como grupo control 1, el grupo 2 (n= 4, embrión híbrido), que sirvió como grupo de control 2, el grupo 3 (n= 4 embrión híbrido + P4), recibió diariamente 25 mg (0.50 ml) de progesterona natural por vía intramuscular, durante la semanas 7 a la 22 de la gestación, el grupo 4 (n=4, embrión híbrido +Tadalafil), el cual recibió diariamente 5 mg de Tadalafil (*Cialis*) por vía oral , durante las semanas 14 a 20 de la gestación, el grupo 5 (n= embrión híbrido+P4+Tadalafil) recibió diariamente 25 mg (0.50 ml) de progesterona natural vía intramuscular de la semana 7 a la 22 y 5mg de Tadalafil por vía oral, durante las semanas 14 a 20 de la gestación.

La P4 se inició en la semana 7 debido a que antes de ese momento la mayor parte de la progesterona es producida por el (los) cuerpo(s) lúteo(s) de la

gestación, producción que es independiente del tipo de embrión presente en el útero pero que sí podría ser afectada por la administración exógena de progesterona debido a la retroalimentación negativa. En cambio, a partir de la semana 7 la placenta produce cantidades crecientes de progesterona en gestaciones domésticas, mientras que en gestaciones híbridas hay una deficiente producción de progesterona placentaria. La P4 dejó de administrarse en la semana 22 para no interferir con el inminente parto.

El tratamiento con Tadalafil se realizó de la semana 14 a la 20 de gestación con el objeto de favorecer la angiogénesis placentaria durante el último tercio de la gestación.

Muestras sanguíneas

Se colectaron muestras semanalmente, a partir de la semana 14 de gestación y hasta el momento del parto, las concentraciones séricas de P4, VEGF y PIGF-1, para lo cual se tomaron semanalmente muestras de sangre (7 ml) mediante punción yugular y tubos vacutainer. Una vez tomada la muestra, ésta se dejó reposar por al menos 30min y en un ángulo de 45°, pasado este tiempo, se centrifugó durante dos minutos para después separar el suero, que fue conservado a -20°C hasta su procesamiento.

Determinación de las concentraciones séricas de P4, VEGF y PLGF

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. La sensibilidad del ensayo fue de 0.1 ng/ml y el coeficiente de variación intraensayo fue de 3.09%.

Determinación de los niveles séricos de VEGF

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). La sensibilidad del ensayo fue de 3.58 pg/ml, con un coeficiente de variación intraensayo de 8.26%.

Determinación de los niveles séricos de PIGF-1

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). En el caso de PIGF-1, el límite de detección fue de 2.15 pg/ml y el coeficiente de variación intraensayo fue de 6.85% intraensayo.

Morfometría de las placentas

Las placentas que se recuperaron al parto (Figura 4), fueron extendidas en una mesa para medir su longitud a lo largo y a lo ancho, además de dividir su superficie en cuatro cuadrantes (Figura 5). 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, con el cual se calculó el área de contacto mediante la fórmula $A = \pi r^2$ (Figura 6). Finalmente, se contaron la totalidad de los cotiledones de la placenta y se pesaron los cotiledones obtenidos de cada cuadrante, para poder obtener el promedio de cada gestación (Figura 7). Las crías nacidas fueron pesadas con una báscula portátil (Schmidt, 2005; Calderón *et al.*, 2008; Hernández, 2012; Gómez, 2013).



Figura 4. Recuperación de la placenta después del parto.

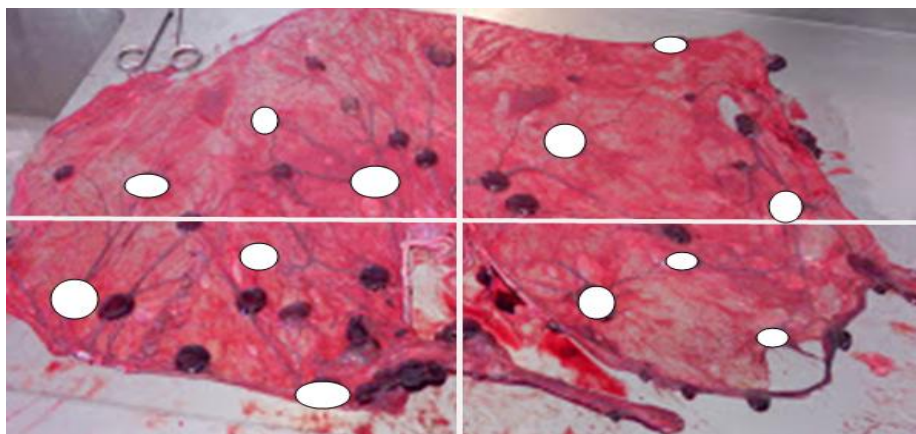


Figura 5. Placenta dividida en cuatro cuadrantes, para la obtención de cotiledones.



Figura 6. Medición de los cotiledones de cada uno de los diferentes cuadrantes.

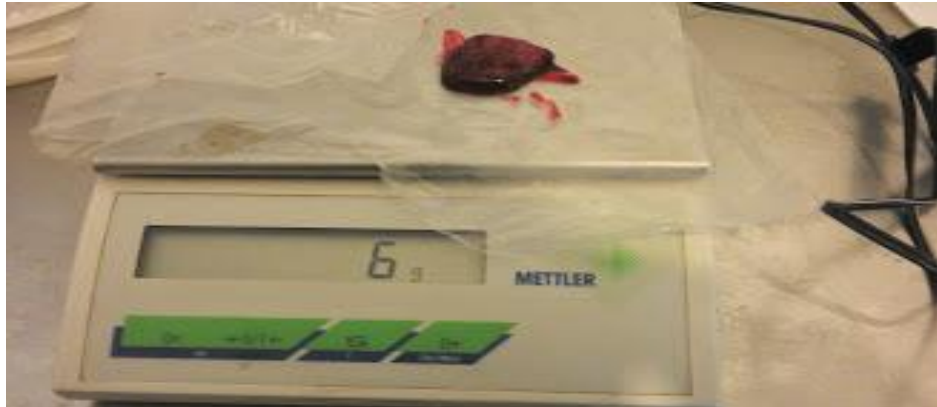


Figura 7. Pesaje de los cotiledones.

Análisis Estadístico

a) Para analizar los perfiles de Progesterona (P4), VEGF Y PIGF-1, se ajustaron a un modelo lineal mixto para medidas repetidas, utilizando el procedimiento MIXED (SAS, 9.3), con el cual, se determinó el efecto del tratamiento en 5 grupos (Embrión Doméstico Sin Tratamiento n=5; Embrión Híbrido Sin Tratamiento n=4; Embrión Híbrido + P4 n=4; Embrión Híbrido + P4 + Tadalafil n=5; Embrión Híbrido + Tadalafil n= 5). El modelo usado es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \Phi_i + \text{Borrego} + \epsilon_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} : es la variable respuesta modelada;

μ : es la media general;

Φ_i : es el efecto fijo del i-ésimo grupo (i = Embrión Doméstico Sin Tratamiento; Embrión Híbrido Sin Tratamiento; Embrión Híbrido + P4; Embrión Híbrido + P4 + Tadalafil; Embrión Híbrido + Tadalafil).

Borrego: es el efecto aleatorio de la n-ésimo oveja anidada dentro de su grupo
 \sim niid (0,1);

ϵ_{ij} : es el error aleatorio $\sim N(0,1)$.

La semana de la gestación/borrego se utilizó como sujeto en el enunciado *repeated* del modelo. En la prueba se utilizó una $\alpha=0.05$ (Ducoing, 2009; Daniel, 2005).

b) Para determinar las concentraciones de Progesterona (P4), VEGF Y PIGF-1 a través de los tercios de la gestación los datos se analizaron mediante un modelo factorial 2x5. El modelo usado es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \Phi_i + \beta_j + \Phi^*\beta_{ij} + \epsilon_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} : es la variable respuesta modelada;

μ : es la media general;

Φ_i : es el efecto fijo del i-ésimo grupo (i =2do tercio, 3er tercio);

β_j : es el efecto fijo de la j-ésimo grupo (j = Embrión Doméstico Sin Tratamiento; Embrión Híbrido Sin Tratamiento; Embrión Híbrido + P4; Embrión Híbrido + P4 + Tadalafil; Embrión Híbrido + Tadalafil).

$\Phi^*\beta_{ij}$: es el efecto fijo de la interacción de Tercio y Grupo;

ϵ_{ij} : es el error aleatorio $\sim N(0,1)$

En la pruebas se utilizó una $\alpha=0.05$. Se utilizó el programa estadístico SAS 9.3 (Ducoing, 2009; Daniel, 2005).

c) Para el análisis de las variables longitud de la gestación, peso al nacimiento, medidas placentarias, número de cotiledones, área de los cotiledones y peso de los cotiledones, se realizó un ANOVA y la prueba de Tukey para la contratación de medias. El modelo usado es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \Phi_i + \epsilon_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} : es la variable respuesta modelada;

μ : es la media general;

Φ_i : es el efecto fijo del i -ésimo grupo (i = Embrión Doméstico Sin Tratamiento; Embrión Híbrido Sin Tratamiento; Embrión Híbrido + P4; Embrión Híbrido + P4 + Tadalafil; Embrión Híbrido + Tadalafil);

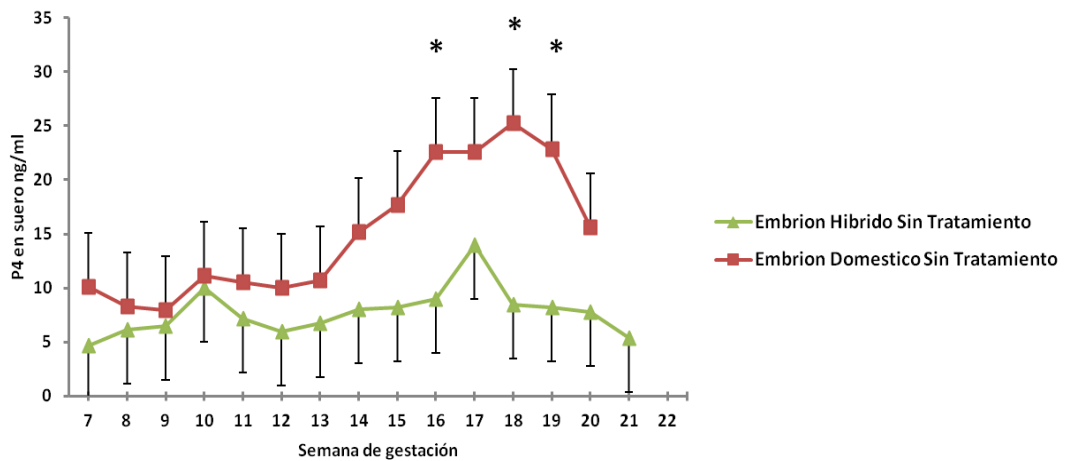
ϵ_{ij} : es el error aleatorio $\sim N(0,1)$

En la pruebas se utilizó una $\alpha=0.05$. Se utilizó el programa estadístico SAS 9.3 (Ducoing, 2009; Daniel, 2005).

VII. RESULTADOS

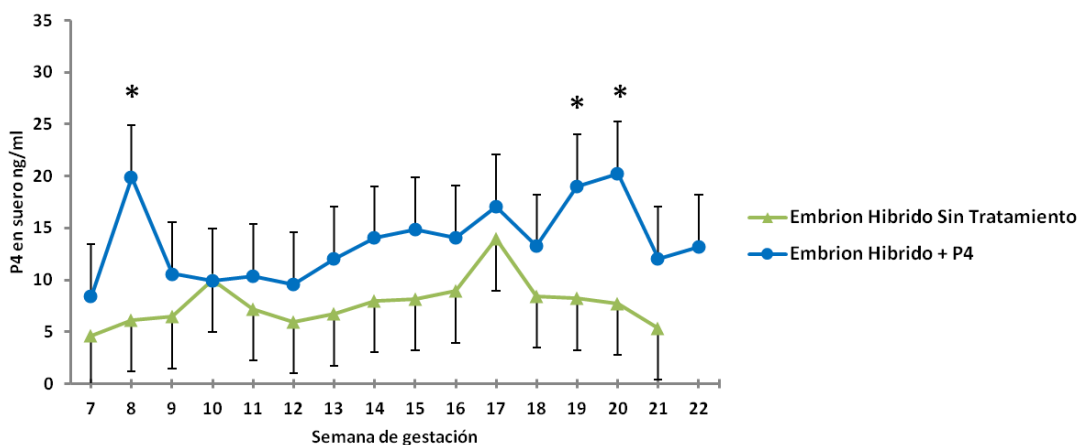
Efecto del grupo y tratamiento sobre las concentraciones séricas de Progesterona (P4) a lo largo de la gestación.

El perfil de Progesterona medido semanalmente a lo largo de la gestación del grupo con embrión de oveja doméstica y el grupo con embrión híbrido sin tratamiento se presenta en la gráfica 1. Entre las semanas 7 y 13 de la gestación las concentraciones de progesterona fueron similares en ambos grupos. Sin embargo a partir de la semana 14 las concentraciones comenzaron a elevarse en forma mucho más marcada en las ovejas con gestación doméstica que en aquellas con gestación híbrida, por lo que las diferencias entre ambos grupos fueron ampliándose hasta ser significativamente mayores en las ovejas con gestación doméstica ($p<0.05$) en las semanas 16, 18 y 19.



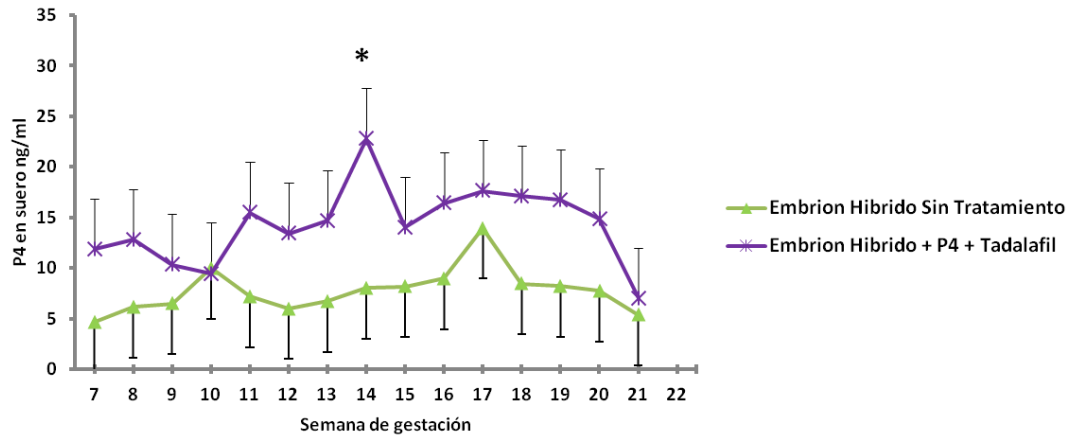
Gráfica 1. Concentraciones semanales de P4 en suero en gestaciones con embrión doméstico sin tratamiento (n=5) o con embrión híbrido sin tratamiento (n=4). * Los asteriscos indican diferencias significativas al nivel de $p < 0.05$ entre grupos para cada periodo de tiempo.

En la gráfica 2 se observa que el grupo de gestación híbrida que recibió tratamiento con progesterona presentó mayores concentraciones de esta hormona que las ovejas no tratadas con el mismo tipo de gestación, siendo la diferencia entre ambos grupos significativa en las semanas 8, 19 y 20 ($p < 0.05$).



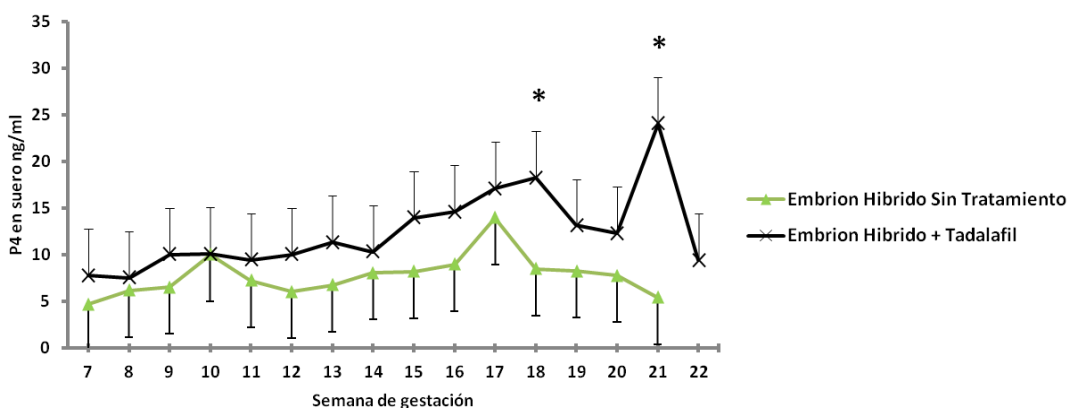
Gráfica 2. Concentraciones semanales de P4 en suero en gestaciones con embrión híbrido sin tratamiento (n=4) y embrión híbrido tratado con P4 (n=4). * Los asteriscos indican diferencias significativas al nivel de $p < 0.05$ entre grupos para cada periodo de tiempo.

En la gráfica 3 se observa que el grupo con gestación híbrida que recibió tratamiento con progesterona y tadalafil también tuvo mayores concentraciones de progesterona que las ovejas testigo con gestación híbrida, aunque la diferencia entre ambos grupos solamente fue significativa en la semana 14.



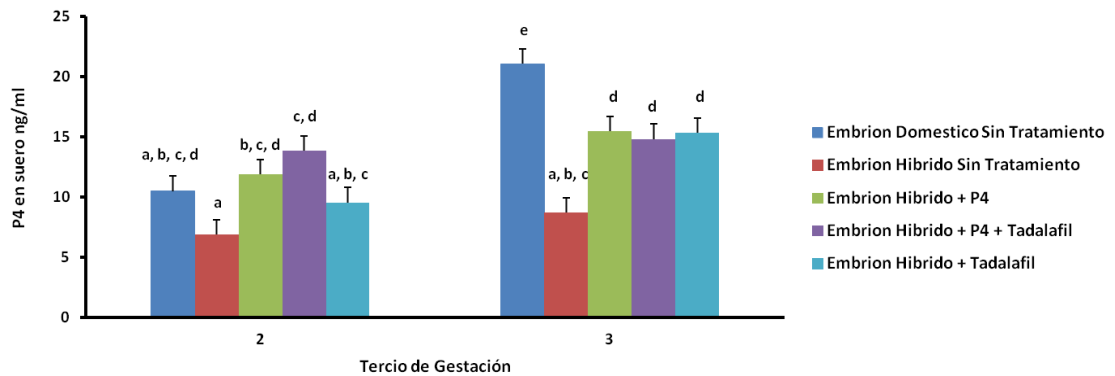
Gráfica 3. Concentraciones semanales de P4 en suero de gestaciones con embrión híbrido sin tratamiento (n=4) o de embrión híbrido con tratamiento de P4 y Tadalafil (n=5). * El asterisco Indica diferencia significativa al nivel de $p < 0.05$ entre grupos para cada periodo de tiempo.

En la gráfica 4 se observa que el tratamiento solo con tadalafil también incrementó las concentraciones de progesterona en las ovejas con gestación híbrida en comparación con las no tratadas. La diferencia entre ambos grupos fue significativa en las semanas 18 y 21.



Gráfica 4. Concentraciones semanales de P4 en suero ng/ml en gestaciones con embrión híbrido sin tratamiento (n=4) o con embrión híbrido y tratamiento con Tadalafil n=5. * El asterisco indica diferencias significativas al nivel de $p < 0.05$ entre grupos para cada periodo de tiempo.

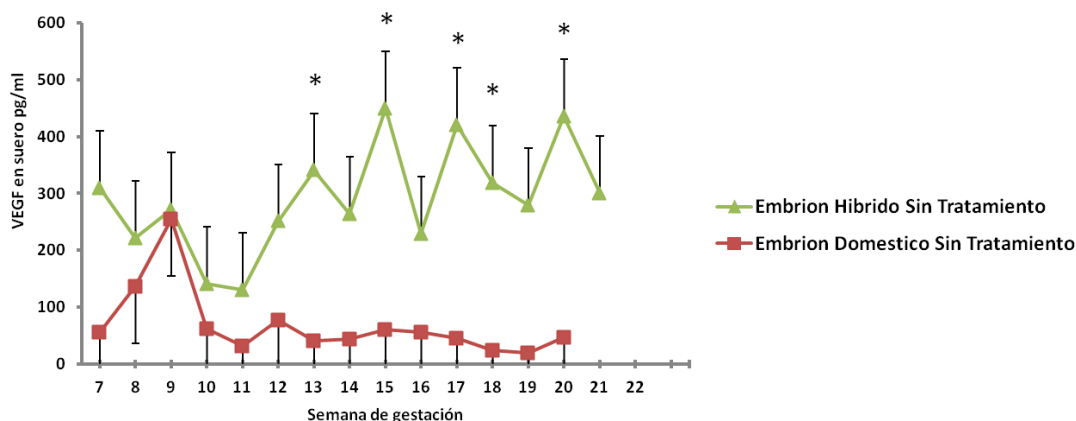
En la gráfica 5 se observa que en tanto en el segundo como en el tercer tercio de la gestación el grupo con menores concentraciones de progesterona fue el de gestación con embrión híbrido sin tratamiento. Todos los tratamientos incrementaron las concentraciones de progesterona en gestaciones híbridas, aunque en el segundo tercio solamente hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) entre dicho grupo y los grupos con gestación híbrida que recibieron tratamiento con progesterona. En cambio, durante el tercer tercio de la gestación las concentraciones de progesterona en el grupo de gestación híbrida sin tratamiento fueron significativamente menores ($p < 0.05$) que las de todos los otros grupos. Por otra parte, los únicos grupos en los que las concentraciones de progesterona fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) durante el tercer tercio de la gestación en comparación con el segundo tercio fueron el grupo de embrión doméstico sin tratamiento y el de embrión híbrido tratado con tadalafil. Vale la pena destacar que durante el tercer tercio de la gestación las concentraciones de progesterona en las ovejas con gestación de embrión doméstico fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) a los de todos los demás grupos, incluyendo a aquellos que recibieron progesterona exógena.



Gráfica 5. Diagramas de barras de la concentración de progesterona por tercio de gestación de acuerdo al tipo de gestación y tratamiento. ^{a,b,c,d} para una determinada variable, los valores con distinta literal son estadísticamente diferentes (< 0.05).

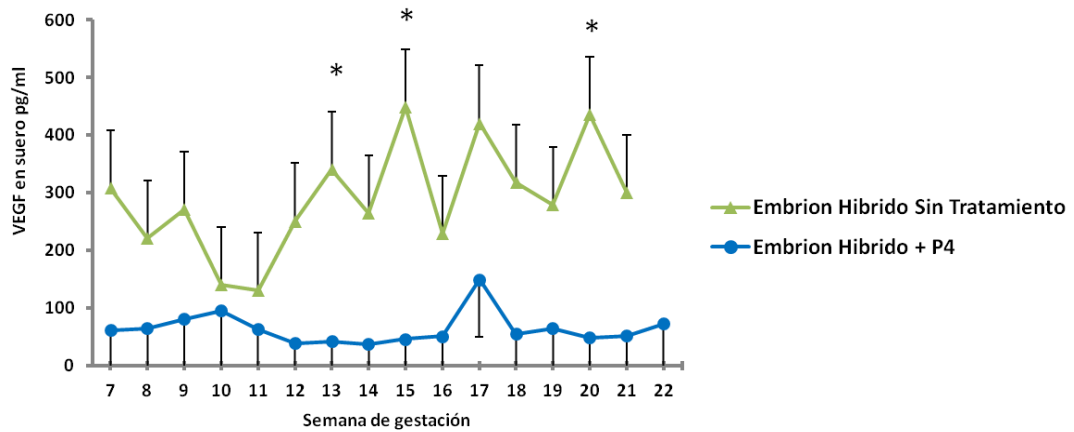
Efecto del grupo y tratamiento sobre las concentraciones séricas de VEGF a lo largo de la gestación.

Con excepción de la semana 9, las concentraciones semanales de VEGF siempre fueron numéricamente superiores en las ovejas testigo con gestación híbrida que en las ovejas con gestación doméstica. La diferencia entre ambos grupos fue significativa ($p < 0.05$) en las semanas 13, 15, 17, 18 y 20 (gráfica 6).



Gráfica 6. Concentraciones de VEGF en suero en gestaciones con embrión doméstico sin tratamiento ($n=5$) y con embrión híbrido sin tratamiento ($n=4$). * Los asteriscos indican diferencias significativas al nivel de $p < 0.05$ entre grupos para cada periodo de tiempo.

En las ovejas con gestación híbrida, la administración de progesterona provocó una importante reducción en las concentraciones de VEGF con respecto a las híbridas no tratadas, aunque las concentraciones de VEGF solo fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$) entre ambos grupos en las semanas 13, 15 y 20 (gráfica 7). Cabe destacar que las concentraciones de esta hormona en las ovejas con gestación híbrida tratadas con progesterona (gráfica 7) fueron muy similares a las de las ovejas con gestación de embrión doméstico (gráfica 6).



Gráfica 7. Concentraciones semanales de VEGF pg/ml en gestaciones con embrión híbrido sin tratamiento (n=4) o con embrión híbrido y tratamiento con P4 (n=4). * Los asteriscos indican diferencias significativas al nivel de $p < 0.05$ entre grupos para cada periodo de tiempo.

Cuando las ovejas con gestación híbrida fueron tratadas con progesterona + tadalafil se produjo una reducción en las concentraciones de VEGF con respecto a las ovejas con gestación híbrida no tratadas (gráfica 8), aunque la diferencia entre ambos grupos solamente alcanzó significancia estadística ($p < 0.05$) en la semana 15 de la gestación. Durante el resto de la gestación las diferencias entre las ovejas no tratadas y las tratadas con tadalafil fueron menores a las observadas entre las ovejas testigo y las ovejas tratadas ya sea con progesterona o con progesterona + tadalafil.

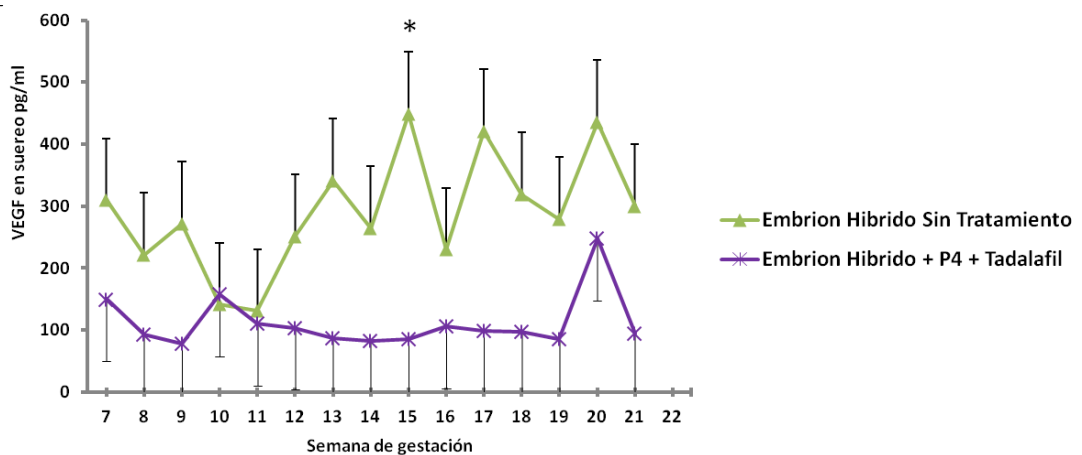
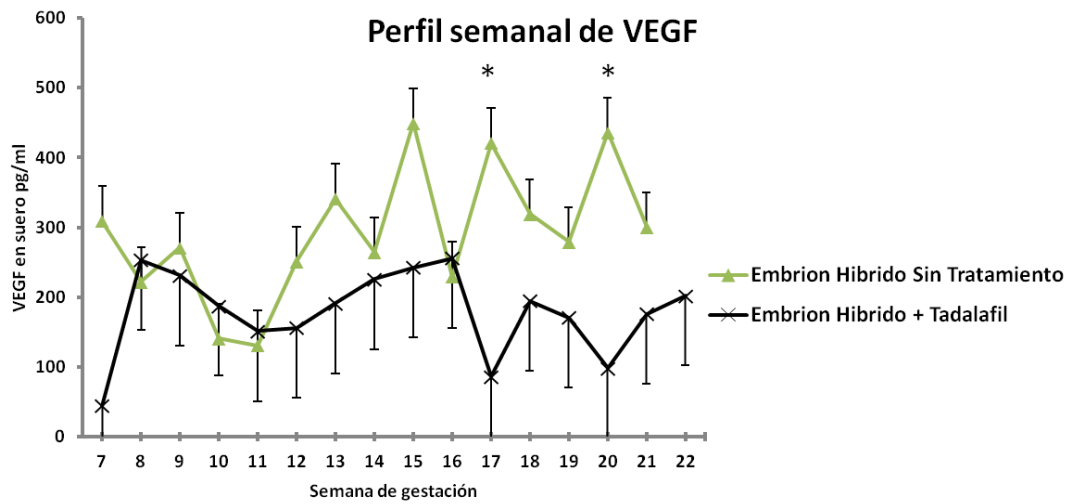


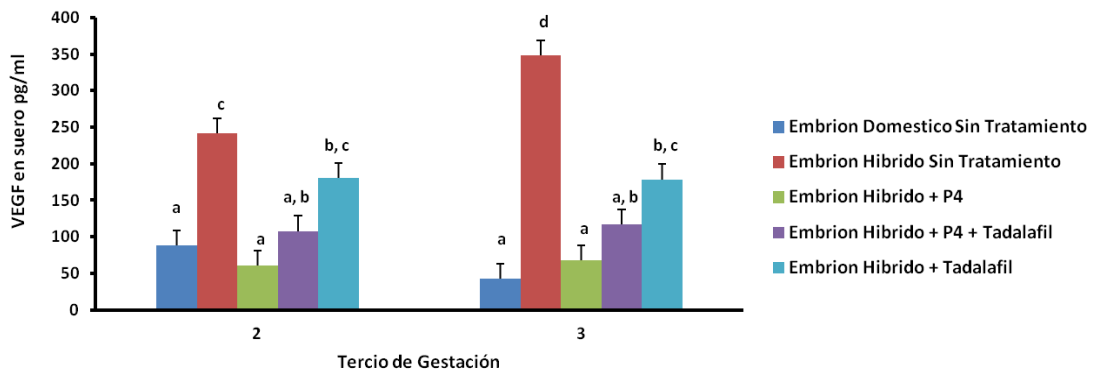
Gráfico 8. Concentraciones semanales de VEGF en suero en gestaciones con embrión híbrido sin tratamiento (n=4); o con embrión híbrido y tratamiento con P4 y Tadalafil (n=5). * El asterisco Indica diferencias significativas al nivel de $p < 0.05$ entre grupos para cada periodo de tiempo.

Por otra parte, las ovejas con gestación híbrida que fueron tratadas solamente con tadalafil tuvieron concentraciones significativamente menores ($p < 0.05$) de VEGF que las ovejas testigo con gestación híbrida en las semanas 7, 17 y 20 (Gráfica 9).



Gráfica 9. Concentraciones semanales de VEGF en suero en gestaciones con embrión híbrido sin tratamiento ($n=4$) o con embrión híbrido y tratamiento con Tadalafil ($n=5$). * Los asteriscos indican diferencias significativas al nivel de $p < 0.05$ entre grupos para cada periodo de tiempo.

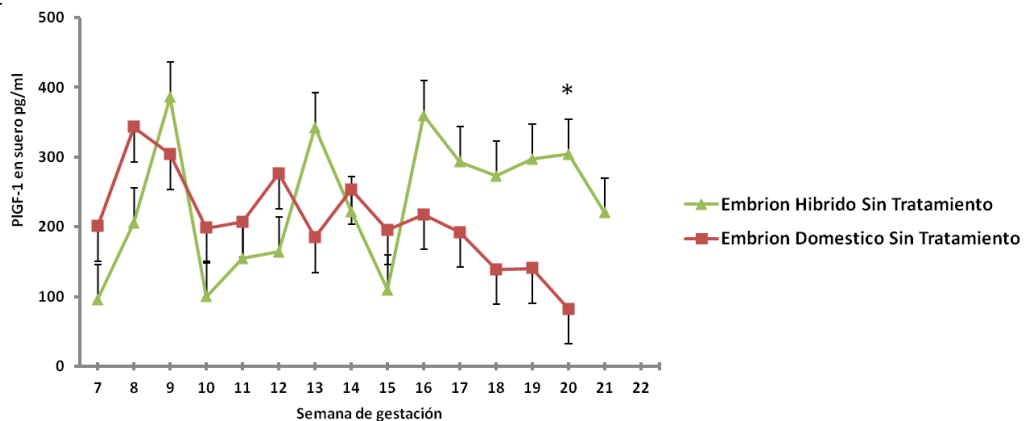
En la gráfica 10 se observa que durante el segundo tercio de la gestación las concentraciones de VEGF del grupo con gestación híbrida sin tratamiento fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) que las del resto de los grupos con excepción del grupo tratado con tadalafil. Durante el último tercio de la gestación las concentraciones de VEGF en el grupo híbrido sin tratamiento fueron significativamente mayores que las de todos los otros grupos. El único grupo en el que las concentraciones de VEGF aumentaron en forma significativa entre el segundo y el tercer tercio de la gestación fue el de gestaciones híbridas sin tratamiento ($p < 0.05$)



Gráfica 10. Diagramas de barras de la concentración de VEGF por tercio de gestación de acuerdo al tipo de gestación y tratamiento. ^{a,b,c,d} para una determinada variable, los valores con distinta literal son estadísticamente diferentes (< 0.05).

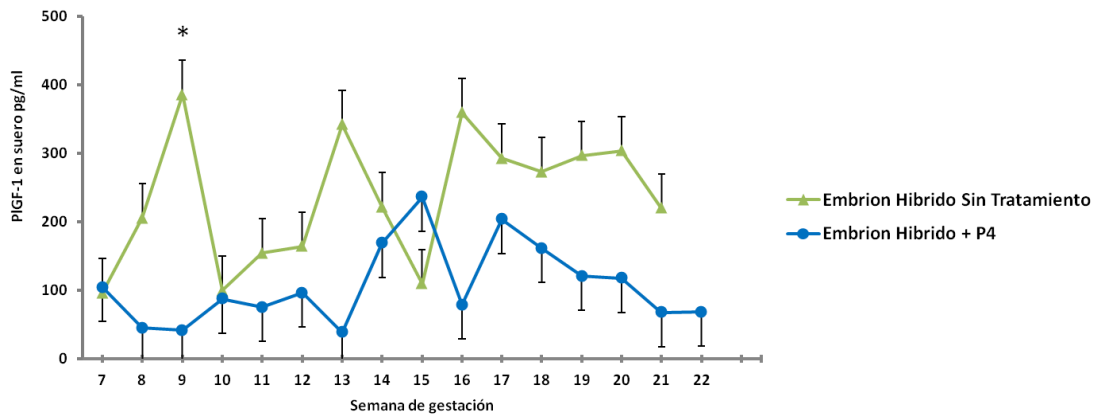
Efecto del grupo y tratamiento sobre las concentraciones séricas de PIGF-1 a lo largo de la gestación.

En la gráfica 11 se observa que las concentraciones de PIGF-1 de las ovejas con gestación de embrión doméstico y las de ovejas con gestación híbrida que no recibieron tratamiento fueron similares entre la semana 7 y la semana 16 de la gestación. Sin embargo, a partir de la semana 17 las concentraciones en las gestaciones híbridas comenzaron a descender, lo que no ocurrió en las gestaciones domésticas. La diferencia entre ambos grupos alcanzó a ser significativa ($p < 0.05$) en la semana 21.



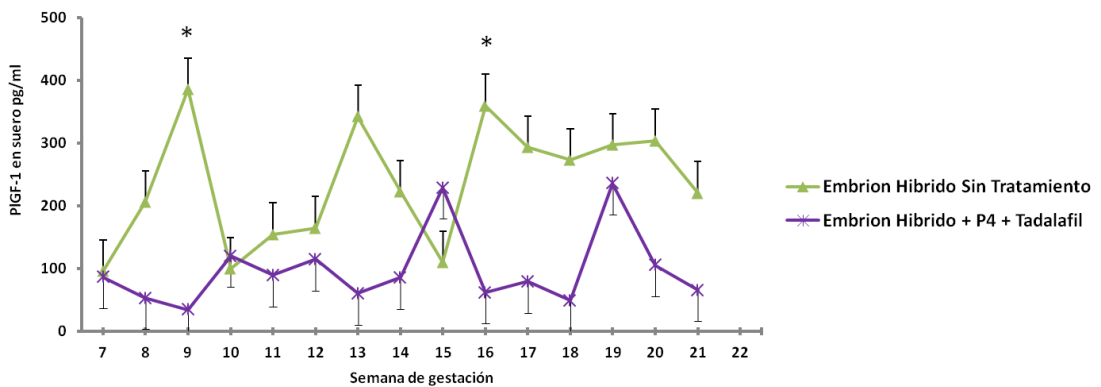
Gráfica 11. Concentraciones semanales de PIGF-1 en suero en gestaciones con embrión doméstico sin tratamiento ($n=5$) o embrión híbrido sin tratamiento ($n=4$). * El asterisco indica el momento en que se presentaron diferencias significativas al nivel de $p < 0.05$ entre grupos.

En la gráfica 12 se observa que al tratar con progesterona a las ovejas gestantes con embrión híbrido se produjo una reducción en las concentraciones de PIGF-1 en comparación a las ovejas con gestación híbrida no tratadas. Aunque la diferencia entra ambos grupos solamente fue significativa ($p < 0.05$) en la semana 9, la reducción observada en el grupo tratado hizo que las concentraciones de este grupo después de la semana 16 fueran muy parecidas a las observadas en el mismo periodo en las ovejas con gestación de embrión doméstico (gráfica 11).

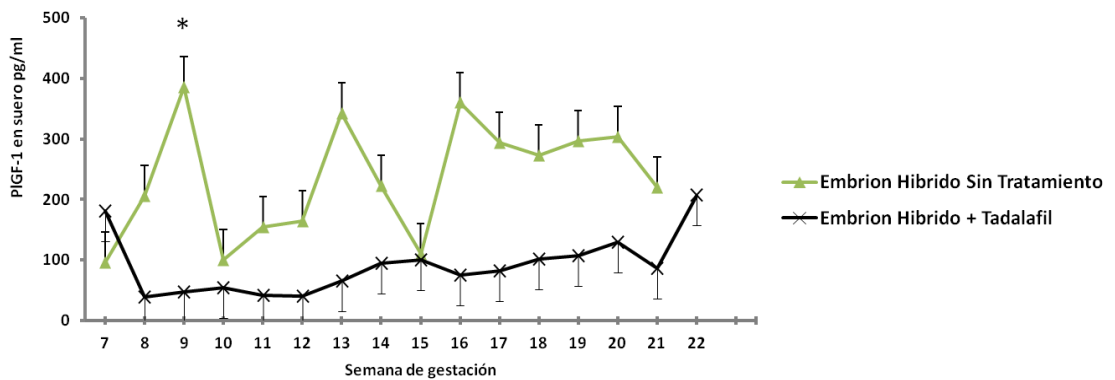


Gráfica 12. Concentraciones semanales de PIGF-1 pg/ml en gestaciones con embrión híbrido sin tratamiento $n=4$ o con embrión híbrido y tratamiento con P4 ($n=4$). * El asterisco indica el momento en que se presentaron diferencias significativas al nivel de $p < 0.05$ entre grupos.

El tratamiento de ovejas con gestación híbrida con progesterona + tadalafil (gráfica 13) o con tadalafil solamente (gráfica 14) también redujo las concentraciones de PIGF-1 en comparación con las observadas en ovejas testigo con gestación híbrida, siendo la diferencia significativa ($p < 0.05$) en el primer caso en las semanas 9 y 16, y en el segundo en la semana 9.



Gráfica 13. Concentraciones semanales de PIGF-1 en suero en gestaciones con embrión híbrido sin tratamiento ($n=4$) o con embrión híbrido y tratamiento con P4 y Tadalafil ($n=5$). * Los asteriscos indican momentos en los que hubo diferencias significativas al nivel de $p < 0.05$ entre grupos.



Gráfica 14. Concentraciones semanales de PIGF-1 en suero en gestaciones con embrión híbrido sin tratamiento (n=4) o con embrión híbrido y tratamiento con Tadalafil (n=5). *el asterisco indica el momento en el que se produjeron diferencias significativas al nivel de $p < 0.05$ entre grupos.

En el gráfico 15 se observa que durante el segundo tercio de la gestación no hubo diferencias significativas entre las concentraciones de PIGF-1 de las ovejas con gestación doméstica y las ovejas con gestación híbrida que no recibieron tratamiento ($p > 0.05$). Todos los tratamientos aplicados a las ovejas con gestación híbrida provocaron durante el segundo tercio de la gestación concentraciones de PIGF-1 significativamente más bajas ($p < 0.05$) que las encontradas en el mismo periodo en las ovejas testigo con cualquier tipo de gestación. En la misma gráfica 15 se observa que durante el tercer tercio de la gestación las ovejas tratadas (con cualquiera de los tratamientos) tuvieron concentraciones significativamente menores que las de las ovejas testigo con gestación híbrida, pero no diferentes a los de las ovejas con gestación doméstica.

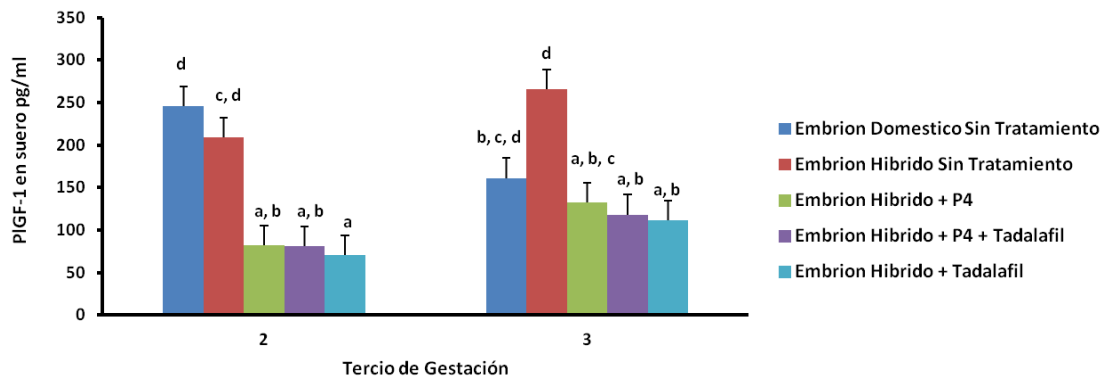


Gráfico 15. Diagramas de barras de la concentración de PIGF-1 por tercio de gestación de acuerdo al tipo de gestación y al tratamiento. ^{a,b,c,d} para una determinada variable, valores con distinta literal son estadísticamente diferentes (< 0.05).

Efecto del grupo y tratamiento sobre la duración de la gestación, peso al nacimiento y las características de la placenta y los cotiledones.

En el cuadro 3 se observa que la duración de la gestación fue significativamente menor en gestaciones con embrión doméstico que en todos los grupos de gestación con embrión híbrido, hayan recibido o no tratamiento ($p < 0.05$).

Cuadro 3. Duración de la gestación (días) de acuerdo al tipo de gestación y tratamiento recibido.

Grupo	Media	EE	
Embrión Híbrido + P4	155.6 ± 1.3	A	
Embrión Híbrido + Tadalafil	152.0 ± 1.2	A	
Embrión Híbrido + P4 + Tadalafil	151.8 ± 1.2	A	
Embrión Híbrido Sin Tratamiento	151,7 ± 1.3	A	
Embrión Doméstico Sin Tratamiento	146,7 ± 1.2	B	

^{A,B} Grupos que no comparten por lo menos una literal son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

El peso de los corderos al nacimiento fue significativamente mayor en los corderos domésticos que en los corderos híbridos de todos los grupos ($p < 0.05$). Entre los corderos híbridos el menor peso se registró en el grupo sin tratamiento, pero las diferencias con respecto a los otros grupos de corderos híbridos no fueron significativas ($P < 0.05$), (Cuadro 4).

Cuadro 4. Peso (kg) de los corderos al nacimiento de acuerdo al tratamiento y tipo de gestación.

Grupo	Media	EE	
Embrión Doméstico Sin Tratamiento	5.64 ± 0.45		A
Embrión Híbrido + P4	3.02 ± 0.45		B
Embrión Híbrido + Tadalafil	2.75 ± 0.41		B
Embrión Híbrido + P4 + Tadalafil	2.57 ± 0.41		B
Embrión Híbrido Sin Tratamiento	2.42 ± 0.46		B

^{A,B} Grupos que no comparten por lo menos una literal son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

La longitud de la placenta no fue estadísticamente diferente entre los grupos ($P > 0.05$) (Cuadro 5). En cambio el ancho de la placenta fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en el grupo con embrión híbrido tratado con progesterona y tadalafil que en el grupo con gestación híbrida sin tratamiento (Cuadro 6). En el resto de los grupos el ancho de la placenta fue intermedio, sin diferencias significativas con respecto a los otros grupos.

Cuadro 5. Longitud de la placenta (cm) de acuerdo al tratamiento y tipo de gestación.

Grupo	Media	EE
Embrión Doméstico Sin Tratamiento	100.8 ± 6.0	
Embrión Híbrido + Tadalafil	90.8 ± 6.0	
Embrión Híbrido Sin Tratamiento	82.2 ± 6.7	
Embrión Híbrido + P4 + Tadalafil	78.6 ± 6.0	
Embrión Híbrido + P4	76.7 ± 6.7	

Las diferencias entre grupos no son significativas ($p < 0.05$)

Cuadro 6. Ancho de la placenta (cm) de acuerdo al tratamiento y tipo de gestación.

Grupo	Media	EE	
Embrión Híbrido + P4 + Tadalafil	32.4 ±	2.4	A
Embrión Híbrido + Tadalafil	29.0 ±	2.4	A B
Embrión Doméstico Sin Tratamiento	23.4 ±	2.4	A B
Embrión Híbrido + P4	22.5 ±	2.4	A B
Embrión Híbrido Sin Tratamiento	19.25 ±	2.7	B

^{A,B} Grupos que no comparten por lo menos una literal son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

En cuanto al número de cotiledones se observa que el grupo con gestación híbrida y tratado con Tadalafil tuvo un número significativamente mayor que el grupo de embrión híbrido que no recibió tratamiento ($p < 0.05$), siendo esta la única diferencia significativa entre los grupos (Cuadro 7).

Cuadro 7. Número de cotiledones de acuerdo al tratamiento y tipo de gestación.

Grupo	Media	EE	
Embrión Híbrido + Tadalafil	76.8 ±	4.6	A
Embrión Híbrido + P4 + Tadalafil	74.4 ±	4.6	A B
Embrión Híbrido + P4	67.5 ±	5.2	A B
Embrión Doméstico Sin Tratamiento	65.0 ±	4.6	A B
Embrión Híbrido Sin Tratamiento	55.5 ±	5.2	B

^{A,B} Grupos que no comparten por lo menos una literal son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

El área de los cotiledones fue significativamente mayor en el grupo de embrión doméstico sin tratamiento que en todos los demás grupos ($p < 0.05$). En las gestaciones híbridas el tratamiento con tadalafil (con o sin progesterona) redujo aún más el área de los cotiledones con respecto al grupo con gestaciones híbridas que no recibió tratamiento ($p < 0.05$). También en el grupo tratado solo con progesterona se produjo una reducción en el área de los cotiledones, pero en este caso la diferencia no fue significativa ($p > 0.05$) con respecto al área de los cotiledones del grupo híbrido que no recibió tratamiento.

Cuadro 8. Área de cotiledones (mm^2) de acuerdo al tratamiento y tipo de gestación.

Grupo	Media	EE	
Embrión Doméstico Sin Tratamiento	6.5 ± 0.4	A	
Embrión Híbrido Sin Tratamiento	3.9 ± 0.4	B	
Embrión Híbrido + P4	2.5 ± 0.4	B	C
Embrión Híbrido + Tadalafil	2.2 ± 0.3	C	
Embrión Híbrido + P4 + Tadalafil	1.7 ± 0.3	C	

^{A,B,C} Grupos que no comparten por lo menos una literal son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

En cuanto al peso de los cotiledones, fue significativamente mayor en el grupo con embrión doméstico sin tratamiento que en los grupos con embrión híbrido sin tratamiento y con embrión híbrido tratado con progesterona + Tadalafil ($p < 0.05$), teniendo el resto de los grupos valores intermedios (Cuadro 9).

Cuadro 9. Peso de los cotiledones de acuerdo al tratamiento y tipo de gestación.

Grupo	Media	EE	
Embrión Doméstico Sin Tratamiento	2.9 ± 0.3	A	
Embrión Híbrido + P4	1.9 ± 0.3	A	B
Embrión Híbrido+ Tadalafil	1.7 ± 0.3	A	B
Embrión Híbrido Sin Tratamiento	1.5 ± 0.3	B	
Embrión Híbrido + P4 + Tadalafil	1.3 ± 0.3	B	

^{A,B} Grupos que no comparten por lo menos una literal son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

VIII. DISCUSIÓN

Progesterona

En los ovinos domésticos se conoce que al inicio de la gestación la progesterona es producida únicamente por el cuerpo lúteo, pero posteriormente la placenta comienza a producir cantidades crecientes de la hormona y a partir del día cincuenta la placenta produce la mayor parte de la progesterona circulante (Su *et al.*, 2004; Lea *et al.*, 2007; Mondragón *et al.*, 2007). Por esta razón en el presente trabajo se evaluaron las concentraciones de progesterona a partir de semana 7 de la gestación, ya que se pretendía comparar las diferencias entre la función placentaria de gestaciones con embrión doméstico y gestaciones con embrión híbrido, así como evaluar los efectos de distintos tratamientos sobre la función placentaria en este tipo de gestación.

En el presente trabajo las concentraciones séricas de progesterona durante las gestaciones con embrión doméstico (gráfica 1) fueron similares a las descritas anteriormente en la literatura para ovejas domésticas (Ranilla *et al.*, 1994; Gómez 2013). En cambio, las ovejas gestantes con embrión híbrido que no recibieron ningún tratamiento presentaron a partir de la semana 11 de la gestación concentraciones menores a las observadas en las ovejas gestantes con embrión doméstico, aunque la diferencia entre ambas solamente alcanzó a ser significativa en ciertas semanas (gráfica 1). Esta diferencia ya había sido observada por Calderón (2008) y por Gómez (2013), quienes las atribuyeron a un menor desarrollo e irrigación placentarios en las ovejas con gestación híbrida. Los resultados del presente trabajo añaden peso a esta hipótesis debido a que tanto el área (cuadro 8) como el peso (cuadro 9) de los cotiledones fueron significativamente menores en las gestaciones híbridas sin tratamiento que en las gestaciones domésticas (cuadro 8). Además existieron diferencias en otras variables que, aunque no fueron significativas, también apuntan a una menor irrigación en las gestaciones híbridas, tales como una menor longitud de la placenta (cuadro 5), menor anchura de la misma (cuadro

6) y un menor número de cotiledones (cuadro 7) en las gestaciones híbridas sin tratamiento con respecto a las gestaciones domésticas.

La administración de progesterona o de progesterona + Tadalafil a ovejas con gestaciones híbridas resultó en una elevación en las concentraciones de progesterona con respecto a las gestaciones híbridas sin tratar, revirtiendo al menos en parte la deficiente producción de progesterona característica de las gestaciones híbridas (gráficas 2,3,4 y 5). En el caso de las ovejas tratadas con progesterona o con progesterona + taladafil se produjo inicialmente una elevación significativa con respecto a las ovejas testigo, reduciéndose esta diferencia a partir de la semana 9 para posteriormente aumentar hasta volver a ser significativa (gráficas 2 y 3). Es posible que después de la elevación inicial en las concentraciones de progesterona provocada por la presencia en la circulación de la hormona administrada en forma exógena, se haya producido una retroalimentación negativa de dicha progesterona exógena sobre la secreción de gonadotropinas, lo que habría resultado en menor secreción de progesterona ovárica, lo que compensaría por la presencia de la progesterona exógena. Sin embargo, conforme la gestación avanzó la secreción de progesterona quedó a cargo de la placenta, órgano que no está sujeto a retroalimentación negativa, por lo que la progesterona exógena comenzó a sumarse a la endógena y la diferencia entre animales tratados y no tratados volvió a hacerse significativa.

En los dos casos recién descritos (tratamiento con progesterona o con progesterona + tadalafil) se administró progesterona exógena, por lo que las elevaciones en las concentraciones de progesterona eran esperadas y casi inevitables. Sin embargo, en el grupo de gestación híbrida tratado solo con tadalafil las concentraciones de progesterona comenzaron a ser ligeramente mayores que en el grupo sin tratar en la semana 12, y la diferencia fue aumentando gradualmente hasta llegar a ser significativa ($p < 0.05$) en las semanas 18 y 21 (gráfica 4). Esta diferencia no puede atribuirse a la administración de progesterona exógena, por lo que debió haber sido

provocada por el tadalafil. Esto sugeriría que, de acuerdo con nuestra hipótesis, el tadalafil podría haber estimulado la circulación placentaria, permitiendo una mayor producción de progesterona. Un indicio en este sentido es que el grupo que fue tratado exclusivamente con tadalafil tuvo mayor longitud y anchura placentarias, mayor número de cotiledones y mayor peso de los cotiledones que el grupo con embrión híbrido que no recibió tratamiento (cuadros 5, 6, 7 y 9). Sin embargo, estas diferencias no llegaron a ser significativas para ninguna de estas variables.

A pesar de los efectos positivos de los tratamientos sobre las concentraciones de progesterona, sobre todo durante el segundo tercio de la gestación (figura 5), con ninguno de los tratamientos se consiguió que durante el último tercio de las gestaciones híbridas las concentraciones de progesterona llegaran a ser tan elevadas como las presentes en gestaciones normales con embrión doméstico (gráfica 5). Esto significa que en las gestaciones híbridas continuó existiendo una deficiencia relativa de progesterona aún en los animales tratados, ya que no se produjo en ellas el marcado incremento que se ha encontrado durante el último tercio de la gestación en gestaciones normales de oveja doméstica tanto en el presente trabajo como en trabajos anteriores (Calderón *et al.*, 2009; Mejía *et al.*, 2011, Gómez, 2013).

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 *et al.*, 2009), tiempo durante el cual ocurre el crecimiento exponencial de los placentomas y del feto (Hansen, 1998; Spencer *et al.*, 2004), por lo que el deficiente aumento en las concentraciones de progesterona durante el segundo y tercer tercio de la gestación en el grupo con embrión híbrido que no recibió tratamiento podría estar relacionado con un reducido desarrollo placentario y con insuficiente crecimiento de algunas estructuras, como los placentomas, cuya consecuencia es el nacimiento de crías pequeñas. Se sabe que el incremento progresivo de las concentraciones de progesterona a lo largo

de la gestación ejerce un efecto importante sobre el crecimiento de las crías, ya que los altos niveles de progesterona circulantes durante la gestación permiten la movilización de ácidos grasos y de glucosa a partir de las reservas corporales de la madre, nutrientes que viajan por 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 ocurrió en el presente estudio. (Manalu-Sumayardi, 1998). Esto concuerda con los resultados del presente trabajo, en el que el menor peso de los corderos se encontró en el grupo con gestaciones híbridas que no recibió tratamiento (cuadro 4), que es precisamente el grupo que tuvo menores concentraciones de progesterona durante la gestación (gráfica 5). Todos los tratamientos resultaron en una mayor producción de progesterona que en las gestaciones híbridas no tratadas, pero las concentraciones nunca llegaron a alcanzar a las encontradas en gestaciones de ovejas domésticas, lo que también concuerda con el hecho de que el peso de los corderos en todos los grupos con gestación híbrida que recibieron algún tratamiento fue siempre intermedio entre el de las gestaciones híbridas no tratadas y el de las gestaciones domésticas (cuadro 4).

Durante las primeras semanas de la gestación en ovejas domésticas con gestaciones intraespecíficas (entre ovejas domésticas) se presentan niveles de progesterona similares en las hembras que gestan una o varias crías, pero a partir de la séptima semana las ovejas que tienen gestación múltiple presentan mayores concentraciones de progesterona (Manalu y Sumaryadi, 1998).

Los efectos de la progesterona sobre el desarrollo del producto no parecen estar limitados a etapas avanzadas de la gestación. En los bovinos se ha demostrado que la administración de progesterona exógena durante los primeros cinco días de vida del embrión acelera el desarrollo de los embriones, estimula la producción de IFN-t (Garret *et al.*, 1988) y resulta en mejores índices de gestación (Mann y Lamming, 1999). Igualmente en ovinos, al administrarse progesterona a partir del día de la ovulación se produce un marcado efecto sobre el desarrollo embrionario, ya que para el día 12 de la

gestación, los embriones de ovejas tratadas con progesterona presentan una forma filamentosa y tienen varios centímetros de longitud, mientras que los de ovejas no tratadas se mantienen esféricos y miden unos cuantos milímetros de diámetro (Satterfield *et al.*, 2006). Este tipo de efecto temprano no puede ser evaluado en el presente trabajo ya que las concentraciones de progesterona solamente comenzaron a ser medidas a partir de la semana 7 de la gestación, pero no existe evidencia de que el tipo de embrión pueda afectar la función inicial del cuerpo lúteo en formación.

VEGF

En las gestaciones con embrión doméstico las concentraciones de VEGF se elevaron en forma importante entre la semana 7 y la semana 9 de la gestación, para posteriormente descender y mantenerse a niveles bajos durante el resto de la gestación, lo que coincide con lo encontrado previamente por Gómez (2013). En cambio en las gestaciones híbridas las concentraciones de VEGF se elevaron en forma paulatina a partir de la semana 10, alcanzando las máximas concentraciones en la semana 15 y manteniéndose elevadas posteriormente, aunque con fluctuaciones semanales. Por esta razón, con excepción de la semana 9 de la gestación, las concentraciones de VEGF en gestaciones híbridas que no recibieron tratamiento de ningún tipo fueron siempre más altas que las de gestaciones con embrión doméstico (gráfica 10), siendo las diferencias entre ambos tipos de gestación significativas ($p < 0.05$) en las semanas 13, 15, 17, 18 y 20 (gráfica 6).

Las elevadas concentraciones de VEGF en las gestaciones híbridas pueden ser indicativas de una deficiente circulación sanguínea en la placenta en este tipo de gestación, ya que en las placentas de las gestaciones híbridas el desarrollo de un medio constantemente hipóxico podría originar la liberación de mayores cantidades de factores inductores de hipoxia (HIFs) y un consecuente incremento en la secreción de VEGF. Bazer (2008) menciona que de

encontrarse la expresión del gen del factor inductor de hipoxia 1A (HIF1A), inducida por la progesterona y estimulado por el IFNt 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.

En la gestación humana se ha estudiado detalladamente una patología llamada pre-eclampsia y su posterior eclampsia, en las cuales se presentan ciertas características similares a las que se pueden observar durante las gestaciones interespecies (*Ovis canadensis* x *Ovis aries*) generadas en el presente trabajo. En la pre-eclampsia humana se presenta síntomas clásicos de hipertensión materna, proteinuria, disfunción endotelial y alteraciones en los factores angiogénicos como el VEGF y el PlGF. Así, Rath y Tripathi (2012) encontraron mayores concentraciones séricas de VEGF en mujeres con este padecimiento, además de encontrar altas concentraciones de su receptor soluble (sVEGF-R1) 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.

Los receptores solubles sVEGFR- 1 y sVEGFR- 2, compiten por el ligando de VEGF con los receptores de membrana, pero sin tener actividad biológica, por lo tanto si ellos aparecen en la gestación compiten con los receptores de membrana para atraer al ligando y si hay mayor presencia de los receptores solubles, VEGF, no tendrá actividad biológica lo que parece resultar lo que resulta en una disminución de la unión y la señalización a través de su principal ruta angiogénica, lo que traerá como consecuencia un 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 (Kaufmann *et al*, 1985; Leiser *et al*, 1985, Kendall y Thomas, 1993; Ahmed *et al*, 2000). Lo que sería compatible con el desarrollo

de una deficiente irrigación placentaria que explicaría el pobre desarrollo de la placenta y del feto observado en el presente trabajo en gestaciones híbridas (Cuadros 4 a 9).

Se ha descrito anteriormente que la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) activa la enzima Oxido Nítrico Sintetasa (NOS), por lo que se libera el Oxido Nítrico (ON) que potencia la acción del VEGF (Shizukuda *et al*, 1999; Vonnahme *et al*, 2005; Zhu *et al*, 2005; Rivas *et al*, 2006). El tratamiento con tadalafil eleva las concentraciones de ON, lo que al mejorar la efectividad del VEGF podría explicar la moderada reducción en las concentraciones de VEGF que el tratamiento con Tadalafil produjo en gestaciones híbridas (gráfica 9), en las que las concentraciones de VEGF durante el segundo y tercer tercio de la gestación se redujeron aproximadamente en un 50 % con respecto a los niveles observados en las mismas etapas en gestaciones híbridas sin tratamiento (gráfica 9), aunque no llegaron a bajar hasta los niveles característicos de una gestación normal con embrión doméstico (gráfica 6).

Una mayor reducción en las concentraciones de VEGF se logró en gestaciones híbridas cuando el tratamiento combinó tadalafil con progesterona comparado con el tratamiento exclusivamente con tadalafil (gráfica 8). Esto podría sugerir un efecto aditivo o sinérgico de ambas sustancias. Sin embargo, la mayor reducción se obtuvo cuando las hembras con gestaciones híbridas fueron tratadas exclusivamente con progesterona (figura 7), en las que las concentraciones de VEGF fueron muy similares a las observadas en ovejas con gestación de embrión doméstico (figura 6). Esto parece indicar que al corregir la deficiencia en las concentraciones de progesterona características de las gestaciones híbridas se reestablece el balance en el sistema VEGF y sus receptores solubles. Sin embargo, este restablecimiento no fue suficiente para permitir un crecimiento normal de la placenta y el feto, ya que aunque la mayoría de los parámetros relacionados con este punto mejoraron en las

gestaciones con embriones híbridos tratados con progesterona y/o tadalafil comparados con las gestaciones híbridas no tratadas, nunca llegaron a igualar a los parámetros obtenidos en las gestaciones con embrión doméstico (cuadros 4 a 9).

PIGF-1

En el presente trabajo, las concentraciones de PIGF-1 fueron similares en gestaciones con embrión doméstico y con embrión híbrido sin tratamiento entre la semana 7 y la semana 14. Sin embargo, las concentraciones de PIGF-1 comenzaron a disminuir a partir de la semana 16 en las ovejas con embrión doméstico, mientras que en las ovejas con embrión híbrido permanecieron elevadas, de tal forma que la diferencia entre ambos tipos de gestación alcanzó significancia estadística ($p < 0.05$) en la semana 21 (gráfica 11). Estos resultados muestran similitud a lo observado en gestaciones humanas con síndrome de restricción de crecimiento intrauterino (IUGR), en las que se produce un aumento en las concentraciones de PIGF-1 durante el último tercio de la gestación en comparación con lo que ocurre en gestaciones normales (Khaliq *et al*, 1999).

Sin embargo, los resultados del presente trabajo contradicen lo encontrado por Gómez (2013), quien al estudiar gestaciones interespecie (*Ovis canadensis x ovis aries*) encontró una disminución en las concentraciones de PIGF-1 durante el último tercio de la gestación. 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.

Los resultados diferentes en ambos trabajos son particularmente difíciles de comprender, pero pueden deberse a diversas causas. Los resultados obtenidos muestran similitud a lo observado en gestaciones humanas con síndrome de restricción de crecimiento intrauterino (IUGR), en las que se produce un aumento en las concentraciones de PIGF-1 durante el último tercio de la gestación en comparación con lo que ocurre en gestaciones normales (Khaliq *et al*, 1999). Se ha demostrado que en el caso de el síndrome de restricción del crecimiento intrauterino (IUGR), existen bajos niveles de VEGF y altas concentraciones de PIGF-1, lo que es explicado por los autores como la existencia de una temprana aparición de hiperoxia en la placenta, lo que conduce a dominar los efectos de PIGF-1 desde el inicio temprano en la gestación, lo que resulta en la disminución de la angiogénesis y el fracaso de la formación de vellosidades terminales, así como en la alteración en la tasa de crecimiento del trofoblasto (khaliq *et al*, 1999; Ahmed *et al*, 2000).

Todos los tratamientos aplicados en el presente trabajo a ovejas con gestaciones híbridas (progesterona, tadalafil, progesterona + tadalafil) redujeron las concentraciones de PIGF-1 de forma tal que durante el último tercio de la gestación las concentraciones de esta hormona fueron similares o aún menores a las presentes durante el mismo periodo en gestaciones normales con embrión doméstico (gráficos 12, 13 y 14). Sin embargo, los efectos de estos tratamientos se hicieron sentir desde etapas más tempranas de la gestación, provocando que durante el segundo tercio de la misma las concentraciones en las gestaciones híbridas que recibieron tratamiento fueron considerablemente más bajas a las presentes en las gestaciones sin tratamiento (tanto domésticas como híbridas). Estos resultados no permiten interpretar el papel del PIGF-1 en el desarrollo de la placenta y el feto ovino,

que fueron deficientes tanto en las gestaciones híbridas tratadas como en las no tratadas, a pesar de que en las tratadas las concentraciones de PIGF-1 fueron menores a las de las gestaciones domésticas mientras que en las híbridas no tratadas fueron mayores a las de las domésticas.

Duración de la gestación y desarrollo placentario

En el presente estudio se encontró que la duración de las gestaciones interespecie fue mayor que la de las borregas domésticas, situación que se hizo aún más marcada en las ovejas que recibieron tratamiento. Esto podría deberse al componente paterno del genotipo fetal, ya que la gestación en la borrega Cimarrón presenta una duración de alrededor de 175 días, mientras que la gestación en las ovejas domésticas es de alrededor de 146 a 148 días (Calderón *et al.*, 2008; Gómez *et al.*, 2013; Mejía *et al.*, 2011, Hernández, 2012).

Al comparar la duración de la gestación de los ovinos de razas de lana larga con las ovejas de lana corta o de pelo se ha encontrado que 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 con menor duración de gestación (Kitts *et al.*, 1984 y 1985).

En el caso de gestaciones resultado de cruzas entre diversas razas de ovejas domésticas se ha demostrado que los embriones F1 (50% de genes de cada raza) resultan en una gestación de duración intermedia entre las que caracterizan a cada una de las razas empleadas para la cruce, independientemente de cuál de ellas sea la raza paterna y cual la materna (Tacheix, 1983). De acuerdo a esto, un embrión híbrido entre *Ovis aries* y *Ovis canadiensis* debería resultar en una gestación de aproximadamente 161 días, lo cual no ocurrió, ya que la duración de las gestaciones híbridas que no recibieron tratamiento en este trabajo fue de 151.7 días, que aunque

significativamente mayor a los 146.7 días de las gestaciones con embrión doméstico fue casi 10 días menor a lo esperado de acuerdo al genotipo del embrión.

Es posible que la duración de la gestación se haya acortado con respecto a lo esperado debido a la incapacidad de una placenta con desarrollado inadecuado para seguir manteniendo la gestación. De esta forma, la hipofunción placentaria podría haber resultado en una hipoxia fetal que resultara en un estrés fetal de magnitud suficiente para que la secreción de cortisol fetal iniciara la cascada de eventos endócrinos que desencadena el parto. Esta posibilidad es apoyada por el hecho de que todos los tratamientos permitieron que la duración de las gestaciones híbridas fuera ligeramente más larga que la de las gestaciones híbridas sin tratamiento (cuadro 3), lo que sugeriría que al corregirse parcialmente algunas de las alteraciones hormonales y de desarrollo placentario de las gestaciones híbridas se pudo expresar mejor el genotipo fetal que promueve una mayor duración de la gestación. El peso de las crías de oveja doméstica fue mayor al de las crías de todos los grupos crías híbridas, lo que coincide con estudios anteriores (Calderón *et al.*, 2008; Gómez *et al.*, 2011, Hernández, 2012). Todos los tratamientos aplicados a ovejas con gestaciones híbridas resultaron en pesos al nacimiento ligeramente mayores que los de crías híbridas del grupo testigo (Cuadro 4), pero las diferencias entre los grupos de gestaciones híbridas en ningún caso fueron significativas ($p > 0.05$), y el peso de las crías híbridas de todos los grupos fue significativamente menor ($p < 0.05$) al de las crías de oveja doméstica. Se conoce que el citrato de sildenafil puede favorecer el crecimiento fetal tras su administración en el embarazo normal (Belik *et al.*, 2005), así como en gestaciones de animales sometidos a hipoxia (Refuerzo *et al.*, 2006) o a deficiencias nutricionales (Carey *et al.*, 2010), probablemente como reflejo de un mayor desarrollo vascular en la placenta. Sin embargo, en el presente modelo de restricción de crecimiento fetal el tadalafil no estimuló significativamente el desarrollo fetal.

En cuanto a la longitud de la placenta, si bien no se encontraron diferencias estadísticas entre grupos, el ancho de la placenta fue mayor en el grupo 4, lo cual es diferente a lo reportado por Gómez (2013) en cuanto a las gestaciones de híbridos de Cimarrón. 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 la 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). 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).

El número de los cotiledones entre las placentas de las gestaciones híbridas y las domésticas fue estadísticamente diferente (Cuadro 7), lo que concuerda con lo reportado previamente por Gómez (2013). En el presente trabajo el menor número de cotiledones se obtuvo en las gestaciones híbridas sin tratamiento y el mayor número en las gestaciones híbridas tratadas con tadalafil (cuadro 7). Es difícil interpretar esta variable debido a que el número de cotiledones depende en gran parte del número de carúnculas en el útero materno (Noakes, 2001), aunque no se descarta que una deficiente angiogénesis pueda interferir con la formación de un placentoma activo y que el tratamiento con tadalafil al favorecer la circulación pudiera haber permitido un adecuado desarrollo en un mayor número de placentomas. En el presente trabajo los distintos tratamientos resultaron en diferencias en las concentraciones de VEGF y PIGF. La arquitectura microvascular del tejido cotiledonario está compuesta de abundantes capilares pequeños los cuales aseguran un transporte sanguíneo rápido, lo que mejoraría el intercambio feto-materno (Reynolds y Redmer, 2001; Reynolds *et al.*, 2005).

En cuanto al área promedio de los cotiledones, existe una diferencia significativa entre los diferentes grupos ($p < 0.05$), resultando con una mayor área el grupo control doméstico, resultados que concuerdan con lo reportado por Gómez (2013). En cuanto al peso de los cotiledones, también se observa una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las gestaciones domésticas y las gestaciones híbridas. Al reducirse el tamaño de las áreas de intercambio placentario (placentomas) se encuentra afectada 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).

La reducción del crecimiento de la placenta en los embriones híbridos podría explicarse inicialmente por la alteración de los diversos factores angiogénicos placentarios como VEGF, PlGF-1 y sus distintos receptores 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 (Reynolds *et al.*, 2005; Gómez, 2013). Los trabajos realizados en placentas de ovejas indican que el desarrollo vascular de los tejidos placentarios, tanto en la porción caruncular como en la cotiledonaria, comienzan en la preñez temprana y continúan durante toda la gestación (Reynolds and Redmer, 2001; Reynolds *et al.*, 2005),

IX. CONCLUSIONES

El presente trabajo permitió evaluar el efecto de diferentes tratamientos, como la aplicación de progesterona y/o tadalafil para incrementar el desarrollo placentario y en consecuencia el tamaño fetal en un modelo de gestación restringida. Los diferentes tratamientos aplicados revirtieron parcialmente las alteraciones en las concentraciones de progesterona, VEGF y PIGF que se producen en gestaciones híbridas de ovinos domésticos y ovinos cimarrón, a pesar de lo cual el desarrollo de la placenta mantuvo diversas alteraciones y el peso de las crías al nacer continuó siendo significativamente menor al de las crías domésticas. El modelo de crecimiento intrauterino restringido planteado en el presente trabajo es consistente y podría aportar información relevante sobre gestaciones comprometidas, no únicamente en animales domésticos sino también en fauna silvestre, ya que contempla la generación y estudio de una gestación entre ovinos domésticos y silvestres. Por lo tanto, podría contribuir a la solución de un problema importante en la salud y el bienestar animal.

X. LITERATURA CONSULTADA

1. Abbott D, Comby P, Charuel C, Graepel P, Hanton G, Leblanc B, Lodola A, Longeart L, Paulus G, Peters C, Stadler J. (2004). Preclinical safety profile of sildenafil. *Int J Impot Res.* 16(6): 498-504.
2. Álvarez-Romero J. y Medellín RA. (2005) *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.
3. Ahmed A, Cudmore M. (2009). Can the biology of VEGF and Haem oxygenases help solve pre-eclampsia? *Biochem Soc Trans.* 37: 1237-1242.
4. Ahmed A., Dunk C., Ahmad S. y Khaliq A. (2000) Regulation of placental vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PlGF) and soluble flt-1 by oxygen (A Review). *Placenta.* 21(14): s16-s24.
5. Ayad A, Sousa MN, Sulon J, Hornick JL, Watts J, Lopez-Gatius F, Iguer-Ouada M, Beckers JF. (2007). Influence of progesterone concentrations on secretory functions of trophoblast and pituitary during the first trimester of pregnancy in dairy cattle. *Theriogenology.* 67: 1503-1511
6. Basset J, Oxborrow T, Smith I, Thornburn G. (1969). The concentration of progesterone in the peripheral plasma of the pregnant ewe. *J. Endocrinol.* 45: 449-457.
7. Bazer FW, Burghardt RC, Johnson GA, Spencer TE, Wu G. (2008). Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell signaling pathways. *Reproductive Biology.* 8 (3): 179-203.
8. Bazer FW, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Wu G. (2009). Comparative aspects of implantation. *Reproduction.* 138: 195-209.
9. Bdolah Y, Karumanchi SA, Sachs BP. (2005). Recent advances in understanding of preeclampsia. *Croat Med J.* 46(5): 728-736.
10. Beavo JA. (1995). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev.* 75: 725-748.

11. Belik J. (2005). Sildenafil administration during pregnancy increases fetal rat weight gain. *FASEB Journal*. 19: A1248.
12. Bogic L.V., Brace R.A. and Cheung C.Y. (2000). Cellular Localization of vascular endothelial growth factor in ovine placenta and fetal membranes. *Placenta*. 21: 203-209.
13. Bogic LV, Brace RA, Cheung CY. (2001). Developmental expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors and VEGF Binding in ovine placenta and fetal Membranes. *Placenta*. 22: 265-275.
14. Borowicz P; Arnold D; Johnson M; Grazul-Bilska A; Redmer D; Reynolds L. (2007). Placental Growth Throughout the Last Two Thirds of Pregnancy in Sheep: Vascular Development and Angiogenic Factor Expression. *Biology of Reproduction*. 76: 259-267.
15. Bowen JA, Bazer FW, Burghardt RC. (1996). Spatial and temporal analyses of integrin and Muc-1 expression in porcine uterine epithelium and trophoctoderm in vivo. *Biol. Reprod*. 55 (5), 1098-1106.
16. Braun T, Li S, Moss J, Newnham J, Challis J, Gluckman P, Sloboda D. (2007). Maternal betamethasone administration reduces binucleate cell number and placental lactogen in sheep. *J of Endocrinology*. 194: 337-347.
17. Briones GJC, Castillo HC, López CJS, Díaz de León PM. Efectos contráctiles dependientes del calcio intracelular inducidos por la serotonina en la arteria umbilical humana. *Gac Méd Méx* 2005;141(6):489-494.
18. Burton GJ, Carole AS, Steven DH. (1976). Ultrastructural studies of placenta of the ewe: phagocytosis of eritrocytes by chorionic epithelium ate the central depression of the cotyledon. *Q J of Exp Physiol*. 61: 275-286.
19. Cahuduri G, Buga G, Gold M, Woods K, Ignarro L. (1991). Characterization and actions of human umbilical endothelium derived relaxing factor. *Br J Pharmacol*. 102:331-336.
20. Calderón RB. (2009). 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.

21. Calderón-Robles B, Mejía-Villanueva O, Gual-Sill F, Pérez-Martínez M. (2008). Características morfométricas de las placentas de borrego Cimarrón (*Ovis canadensis mexicana*), borrego doméstico (*Ovis aries*) y su híbrido Cimarrón x doméstico. *Perspectivas en Zoología Mexicana*. 173-185.
22. Carmeliet P, Collen D. (2009). Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development. *Curr Top Microbial Immunol*. 237: 133-158.
23. Carmeliet P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438: 932-936.
24. Cervantes J, Juárez L, Mejía O, Berruecos M, Vera H, Valencia J. (2007). Use of fluorogestone acetate after breeding to reduce the effect of premature luteal regression in dairy goats when superovulation is induced with FSH. *Anim. Reprod. Sci.* 97: 47-54.
25. Chaiworapongsa T, Espinoza J, Gotsch F, Kim YM, Kim GJ, Goncalves LF, Edwin S, Kusanovic JP, Erez O, Than NG, Hassan SS and Romero R. (2008). The maternal plasma soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 concentration is elevated in SGA and the magnitude of the increase relates to Doppler abnormalities in the maternal and fetal circulation. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 21: 25-40.
26. Charnock-Jones D, Kaufmann P, Mayhew T. (2004). Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. *Placenta*. 25:103-113.
27. Cheon Y-P, Li Q, Xu X, DeMayo FJ, Bagchi IC, Bagchi MK. (2002). A genomic approach to identify novel progesterone receptor regulated pathways in the uterus during implantation. *Mol. Endocrinol*. 16, 2853-2871.
28. Cheung CY, Singh M, Ebaugh MJ, Brace RA. (1995). Vascular endothelial growth factor gene expression in ovine placenta and fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol*. 173 (3 pt 1).

29. Chung B, Matteson K, Voutilainen R, Mohandas T, Miller W. (1986). Human cholesterol and progesterone synthesis in human placental cells in culture by serum lipoproteins. *Endocrinol.* 83: 8962-8966.
30. Clark DE, Smith SK, Sharkey AM and Charnock-Jones DS. (1996). Localization of VEGF and expression of its receptors flt and KDR in human placenta throughout pregnancy. *Hum Reprod.* 11: 1090-1098.
31. Climent S y Bascuas J. (1989). Cuadernos de anatomía y embriología veterinaria. Ed. Marban, Madrid, España. 68-87.
32. Coppage. H Kristin, HD, Sun Xu Ming, HD, PhD, Baker Scott R, Bs, Kenneth E. Clark, PhD. (2005). Expression of phosphodiesterase 5 in maternal and fetal sheep. *Obstetrics and Gynecology.* 1005-1010.
33. Craven CM, Morgan T, Ward K. (1998). Decidual spiral artery remodeling begins before cellular interaction with cytotrophoblasts. *Placenta.* 19:241-252.
34. Daniel W. Bioestadística. (2005). Ed. Limusa, México.
35. De Falco S. (2012). The discovery of placenta growth factor and its biological activity. *Experimental and molecular medicine.* 44(1): 1-9.
36. De Tejada, I. S., Anglin, G., Knight, J. R., & Emmick, J. T. (2002). Effects of tadalafil on erectile dysfunction in men with diabetes. *Diabetes Care.* 25(12), 2159-2164.
37. Delgadillo, A. C., Mejia, O., Berruecos, J. M., & Vásquez, C. (2003). Estudio morfológico de los cromosomas del borrego cimarrón (*Ovis canadensis*), Tabasco o pelibuey (*Ovis aries*) y su cruce. *Vet. Mex.* 34(1), 27-37.
38. Dellman, H. D. Textbook of Veterinary Histology. (1993). 4th ed. Philadelphia, Lea & Febiger.
39. Demir R, Kayisli U, Cayli S, Huppertz B. (2006). Sequential steps during vasculogenesis and angiogenesis in the very early human placenta. *Placenta.* 27:535-539.

40. Diaz FJ, Anderson LE, Wu YL, Rabot A, Tsai SJ, Wiltbank MC. (2002). Regulation of progesterone and prostaglandin F2 α production in the CL. *Mol. Cell. Endocrinol.* 191, 65-80.
41. Ducoing Watty AM. (2009). *Introducción a la Estadística*. Publicaciones FMVZ UNAM.
42. Dorniak P, Bazer FW, Spencer TE. (2011). Prostaglandins regulate conceptus elongation and mediate effects of interferon tau on the ovine uterine endometrium. *Biol. Reprod.* 84 (6), 1119-1127.
43. Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, Lymboussaki A, Mustonen T, Pajusola K, Breitman M and Alitalo K. (1998). Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science*. 282: 946-949.
44. Dunk C and Ahmed A. (2001). Expression of VEGF-C and activation of its receptors VEGFR-2 and VEGFR-3 in trophoblast. *Histol. Histopathol.* 16: 359-375.
45. Duranthon V, Watson AJ, Lonergan P. (2008). Focus on mammalian embryogenomics preimplantation embryo programming: transcription, epigenetics, and culture environment. *Reproduction*. 135: 141-150.
46. Durazo-Quiroz, Francisco. I. (2007). El óxido nítrico en medicina. *Gac Méd Méx*, 143, no 5.
47. Dvorak HF. (2005). *Angiogenesis*. 3: 1835- 1842.
48. Driancourt MA. (2001). Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*. 55, 1211-1239.
49. Ealy AD, Yang QE. (2009). Control of Interferon-Tau expression during early pregnancy in ruminants. *Am. J. Reprod. Immunol.* 61 (2), 95-106.
50. Endothelial Growth Factor-Receptor System in the Gravid Uterus of Yorkshire and Meishan Pigs. *BIOLOGY OF REPRODUCTION*, Volumen 71, pp. 163-169.
51. Espinosa, C.R. (2011). Angiogenesis in the placenta of domestic animals. *Rev. vet.* 22: 2, 131-138.

52. Evans ACO. (2003). Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 78, 289-306.
53. Evans ACO, Duffy P, Hynes N, Boland MP. (2000). Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology* 53, 699-715.
54. Faber JJ & Thornburg KL. (1983). *Placental Physiology. Structure and Function of Fetomaternal Exchange*. Raven Press, New York.
55. Ferrara N and Henzel WJ. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 161: 851-858.
56. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 9(6): 669-676.
57. Ferrara N. and Davis-Smyth T. (1997). The biology of Vascular Endothelial Growth Factor. *Endocrine Reviews.* 18: 4-25.
58. Ferrara N. (2004). Vascular endothelial growth factor. Basic science and clinical progress. *Endocr Rev.* 25:581-611.
59. Ferrara N. (2002). Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol.* 29: 10-14
60. Folkman J, Klagsbrung M. (1987). Angiogenic factors. *Science.* 235: 442-7.
61. Fowden A, Ward J, Wooding F, Forhead A. (2010). Developmental programming of the ovine placenta. *Reproduction in domestic ruminants VII.* 67: 41-57.
62. Frank S, Hubner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S. (1995). Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J. Biol Chem.* 270: 12607- 13.

63. Garret J, Geisert R, Zavy M, Morgan G. (1998). Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. *J Reprod Fert.* 84: 437-446.
64. Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ. (1997). Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science.* 277:1669-72.
65. Gerber HP, Condorelli F, Park J and Ferrara N. (1997). Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem.* 272: 23659-23667.
66. Gille H, Kowalski J, Li B, LeCouter J, Moffat B, Zioncheck TF, Pelletier N, Ferrara N. (2001). Analysis of biological effects and signalling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J Biol Chem.* 276(5): 3222-3230
67. Girling JE, Lederman FL, Walter LM, Rogers PA. (2007). Progesterone, but not estrogen, stimulates vessel maturation in the mouse endometrium. *Endocrinology.* 148(11):5433-5441
68. Godkin JD, Bazer FW, Roberts RM. (1984). Ovine trophoblast protein 1, an early secreted blastocyst protein, binds specifically to uterine endometrium and affects protein synthesis. *Endocrinology.* 114 (1), 120-130.
69. Godkin JD, Bazer FW, Thatcher WW, Roberts RM. (1984). Proteins released by cultured Day 15-16 conceptuses prolong luteal maintenance when introduced into the uterine lumen of cyclic ewes. *J. Reprod. Fertil.* 71 (1), 57-64.
70. Gómez C, Rodríguez A, Murcia C, Mejía O. Determinación de niveles séricos de progesterona y VEGF durante una gestación interespecie (*Ovis aries* x *Ovis canadensis*). (2011). *Memorias del XXXV Congreso Nacional de Buiatría.* Guanajuato, México. 5 pp.
71. Gómez C. Determinación de los niveles séricos de P4, VEGF y PLGF-1 en un modelo de gestación interespecies (*Ovis aries* x *Ovis canadensis*). (2013). México, D.F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM.

72. González-Bulnes A, Souza CJH, Campbell BK, Baird DT. (2004). Systemic and intraovarian effects of dominant follicles on ovine follicular growth. *Anim. Reprod. Sci.* 84, 107-119.
73. Gootwie E, Spencer T, Bazer F. (2007). Litter-size-dependent intrauterine growth restriction in sheep. *Animal.* 1: 547-564
74. Gudea, N. M.; Roberts, C. T.; Kalionisa, B. & King, R. C. (2004). Growth and function of the normal human placenta. *Thrombosis Research.* 114:397-407.
75. Hafez E. Ovejas y cabras. (2002). Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 7th Ed. Interamericana McGraw Hill. 177-187.
76. Hansel W, Convey EM. (1983). Physiology of the estrous cycle. *J. Anim. Sci.* 57 (2), 404-424.
77. Hansen P. (1998). Regulation of uterine immune function by progesterone lessons from the sheep. *J Reprod Immun.* 40: 63-79.
78. Hernández V. Incremento en los niveles de progesterona para favorecer el crecimiento placentario y fetal en gestaciones entre *ovis aries* y *ovis canadensis*. (2012). México, D.F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM
79. Huang Z, Ducharme Y, Macdonald D, and Robichaud A. (2001). The next generation of PDE4 inhibitors. *Curr Opin Chem Biol.* 2001; 5:432- 438.
80. Imakawa K, Anthony RV, Kazemi M, Marotti KR, Polites HG, Roberts RM. (1987). Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophectoderm. *Nature.* 330, 377-379.
81. Imakawa K, Tamura K, Lee R, Ji Y, Kogo H, Sakai S, Christenson R. (2002). Temporal expression on type I interferon receptor in the peri-implantation ovine extra-embryonic membranes: demonstration that human IFN α can bind to this receptor. *Endocr. J.* 49 (2), 195-205.
82. Ing NH, Tornesi MB. (19997). Estradiol up-regulates estrogen receptor and progesterone receptor gene expression in specific ovine uterine cells. *Biol. Reprod.* 56, 1205-1215.

83. Izumi H, Garfield R, Makino Y, Shirazawa K, Itoh T. (1994). Gestational changes in endothelium-dependent vaso-relaxation in human umbilical artery. *Am J Obstet Gynecol.* 170:236-245.
84. Johnson GA, Bazer FW, Jaeger LA, Ka H, Garlow JE, Pfarrer C, Spencer TE, Burghardt R. (2001). Muc-1, integrin, and osteopontin expression during the implantation cascade in sheep. *Biol. Reprod.* 65, 820-828.
85. Kaufmann, P., Black, S., & Huppertz, B. (2003). Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biology of reproduction.* 69(1), 1-7.
86. Kendall RL and Thomas KA. (1993). Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 90: 10705-10709.
87. Khaliq, A., Dunk, C., Jiang, J., Shams, M., Li, X.F., Acevedo, C., Weich, H., Whittle, M., Ahmed, A. (1999). Hypoxia down-regulates placenta growth factor, whereas fetal growth restriction up-regulates placenta growth factor expression: molecular evidence for placental hyperoxia in intrauterine growth restriction. *Lab. Invest.* 79, 151- 170.
88. Kim KJ, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N. (1993). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. *Nature.* 62: 841-4.
89. Kotera J, Fujishige K, and Omori K. (2000). Immunohistochemical localization of cGMP- binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in rat tissues. *JHistochem Cytochem.* 48:685-693.
90. Kourembanas S, Marsden PA, McQuillan LP, Faller DV. (1991). Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium. *J Clin Invest.* 88:1054-7.
91. Lassala A, Bazer F, Cudd T, Datta S, Keisler D, Carey M, et al. (2011). Parenteral administration of L-Arginine enhances fetal survival and growth in sheep carrying multiple fetuses. *J Nutr.* 141: 849-855.
92. Lassala A, Bazer F, Cudd T, Li P, Li X, Satterfield C, et al. (2009) Intravenous administration of L-Citrulline to pregnant ewes is more effective than L-Arginine for increasing arginine availability in the fetus. *J Nutr.* 139: 660-665.

93. Lea G, Wooding P, Stewart I, Hannah T, Morton S, Wallace K, et al. (2007). The expression of ovine placental lactogen, StAR and progesterone-associated steroidogenic enzymes in placenta of overnourished growing adolescent ewes. *Reprod research*. 133: 785-796
94. Li J, Perella MA, Tsai JC, Yet SF, Hsieh CM, Yoshizumi M, Patterson C, Endege WO, Zhou F, Lee ME. (1975). Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol*. 270(1): 308-312.
95. Lin CS, Lau A, Tu R, and Lue TF. (2000). Expression of three isoforms of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in human penile cavernosum. *Biochem Biophys Res Commun* . 268:628-635.
96. Longo LD. (1987). Respiratory gas exchange in the placenta.
97. Loughney K, Hill TR, Florio VA, Uher L, Rosman GJ, Wolda SL, Jones BA, Howard ML, McAllister-Lucas LM, Sonnenburg WK, Francis SH, Corbin JD, Beavo JA, and Ferguson K. (1998). Isolation and characterization of cDNAs encoding PDE5A, a human cGMP- binding, cGMP-specific 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Gene*. 216:139-147.
98. Lugnier C. (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther*. 109:366.
99. Lyall F, Yong A, Boswell F, Kingdom JCP, Greer IA. (1997). Placental expression of vascular endothelial growth factors in placentae from pregnancies complicated by pre-eclampsia and intrauterine growth restriction does not support placental hypoxia at delivery. *Placenta*. 18: 269-276.
100. Madan M.L., Singla S.K., Chauhan and Manik R.S. (1994). In vitro production and transfer of embryos in buffalo. *Theriogenology*. 41:139-143.
101. Malamitsi A, Boutsikou T, Economou E, Sarandakou A, Makrakis E, Hassiakos D, et al. (2005). Vascular Endothelial Growth Factor and Placenta Growth Factor in Intrauterine Growth-Restricted Fetuses and Neonates. *Mediators of Inflammation*. 5:293-297.

102. Manalu W, Sumaryadi MY. (1998). Maternal serum progesterone concentration during pregnancy and lamb birth weight at parturition in Javanese Thin-Tail ewes with different litter sizes. *Small Ruminant Research*. 30: 163-169.
103. Mann G, Lamming G, Robinson R, Wathes D. (1999). The regulation of interferon tau production and uterine hormone receptors during early pregnancy. *J. Reprod. Fert.* 54(1): 317-328.
104. María de Jesús, R., Cerda, R. C., & Blanhir, J. E. M. (2006). Sildenafil e inhibidores de fosfodiesterasa en hipertensión pulmonar. *Neumología y Cirugía de Tórax*. 65(4), 186-200.
105. Maru Y, Yamaguchi S, Shibuya M. (1998). Flt-1, a receptor for vascular endothelial growth factor, has transforming and morphogenic potentials. *Oncogene*. 16(20): 2585-2595.
106. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, et al. (2003). Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest*. 111:649-58.
107. McCarthy FP, Kingdom JC, Kenny LC, Walsh SK. (2011). Animal models of preeclampsia; uses and limitations. 32: 413-419.
108. Mejía V.O., Cervantes M.J., Peña R.M., Palma I.M., Cinco F.F., Gurrola D.I. Características reproductivas en híbridos de Cimarrón (*Ovis canadensis mexicana* x *Ovis aries*). (2001). II Congreso Latinoamericano de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos. XI Congreso Nacional de Producción Ovina. Yucatán, México. 5 pp.
109. Mejía VO., Murcia MC, Soto MS, Moreno LA, Artee FJ. (2011). 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.
110. Mejía-Villanueva O, F Gual-Sill, 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*). (2008). XIX Congreso Nacional de Zoología. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

111. Mejía O. (2010). Características Reproductivas de los Ovinos y los Caprinos. En: Departamento de Educación Continua. Memorias del curso teórico-práctico en Transferencia de Embriones en Ovinos y Caprinos Octubre 13-14; Chapa de Mota Edo. de Mex, México. 1-10.
112. Méndez HJ. (2010). Expresión de VEGF y sus receptores en Folículos dominantes del estro y Folículos sanos y atrésicos del día seis del ciclo estral (Tesis Maestría). México DF, México: FMVZ UNAM.
113. Miller S, Loose J, Jenkin G, Wallace E. (2009). The effects of sildenafil citrate (Viagra) on uterin blood flow and well being in the intrauterine growth-restricted fetus. *Am J Obstet Gynecol.* 200: 102, 1-7.
114. Mine, O. M., Kedikilwe, K., Ndebele, R. T., & Nsoso, S. (2000). Sheep-goat hybrid born under natural conditions. *Small Ruminant Research.* 37(1), 141-145.
115. Molskness TA, Stouffer RL, Burry KA, Gorrill MJ, Lee DM and Patton PE. (2004). Circulating levels of free and total vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, soluble VEGF receptors-1 and -2, and angiogenin during ovarian stimulation in non-human primates and women. *Hum Reprod.* 19: 822-830.
116. Mondragón J, Ocadiz-Delgado R, Miranda C, Valencia J, Rosales A, Gariglio P, et al. (2007). Expression of P450-aromatase in the goat placenta throughout pregnancy. *Theriogenology* 2007; 68: 646-653.
117. Monson G, Summer. (1990). *The Desert Bighorn. Its Life History, Ecology and Management.* The University of Arizona Press.
118. Morrison JL. (2008). Sheep models of intrauterine growth restriction: fetal adaptations and consequences (Brief Review). *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* 35: 730–743.
119. Murray MK. (1995). Epithelial lining of the sheep ampulla oviduct undergoes pregnancy-associated morphological changes in secretory status and cell height. *Biol. Reprod.* 53, 653-663.
120. Myatt I, Brewer A, Brockman D. (1991). The action of nitric oxide in the human feto-placental circulation. *Am J Obstet Gynecol.* 164:507-513.

121. Nagamatsu T, Fujii T, Kusumi M, Zou L, et al. (2004). Cytotrophoblasts up-regulate soluble fms-like tyrosine kinase-1 expression under reduced oxygen: an implication for the placental vascular development and the pathophysiology of preeclampsia. *Endocrinology*. 145:4838-45.
122. Nanaev AK, Chwalisz K, Frank HG, Kohnen G, Hegele-Hartung C, Kaufmann P. (1995). Physiological dilation of uteroplacental arteries in the guinea pig depends on nitric oxide synthase activity of extravillous trophoblast. *Cell Tissue Res*. 282:407-421.
123. Navarro, J. G., Bendito, A. S. Tadalafilo. (2011). nuevos aspectos de la inhibición de la fosfodiesterasa tipo 5 en el tratamiento de la hipertensión pulmonar. *Archivos de Bronconeumología*. 47, 26-31.
124. Niswender GD. (2002). Molecular control of luteal secretion of progesterone. *Reproduction*. 123, 333-339.
125. Niswender, G.D., Nett, T.M. (19994). Corpus luteum and its control in infraprimate species. In *The Physiology of Reproduction*.
126. Ogando, D. G., Paz, D., Cella, M. & Franchi, M. (2003). The fundamental role of increased production of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced embryonic resorption in mice. *Reproduction*. 125, 95-110.
127. Ortiz R, Jacinto J, Gual F, Moreno A, Mejía O. (2011). Fertilidad de ovejas domésticas receptoras de embriones híbridos de Cimarrón (*Ovis canadensis* x *Ovis aries*). *Memorias del XXXV Congreso Nacional de Buiatría*. Guanajuato, México. 5 pp.
128. Owens J, Falconer J, Robinson J. (1989). Glucose metabolism in pregnant sheep when placental growth is restricted. *J Dev Physiol*. 257: 350-357.
129. Partanen TA, Paavonen K. (2001). Lymphatic versus blood vascular endothelial growth factors and receptors in humans. *Microsc Res Tech*. 55: 108-121.
130. Porrás-Almeraya A, Zarco-Quintero LA, Valencia-Méndez J. Estacionalidad reproductiva en ovejas. (2003). *Ciencia Veterinaria*; 9(4)

131. Power GAS, Patrick JE, Carson GD, Challis JRG. (1982). The fetal membranes as possible source of progesterone in the amniotic and allantoic fluids of pregnant sheep. *Endocrinology*. 110(2).
132. Rahimi, N., Dayanir, V., Lashkari, K. (2000). Receptor chimeras indicate that the vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) modulates mitogenic activity of VEGFR-2 in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 275, 16986– 16992.
133. Rajakumar A, Conrad KP. (2000). Expression, ontogeny, and regulation of hypoxia-inducible transcription factors in the human placenta. *Biol Reprod.* 63:559-69.
134. Ranilla MJ, Sulon J, Carro MD, Mantecon AR, Becker JF. (1994). Plasmatic profiles of pregnancy-associated glycoprotein and progesterone levels during gestation in churra and merino sheep. *Theriogenology*. 42: 537-545.
135. Rath G y Tripathi R. (2012). VEGF and its soluble receptor VEGFR-2 in hypertensive disorders during pregnancy: the Indian scenario. *Journal of Human Hypertension*. 26(3):196-204.
136. Refuerzo JS, Sokol RJ, Aranda JV, Hallak M, Hotra JW, Kruger M, Sorokin Y. (2006). Sildenafil citrate and fetal outcome in pregnant rats. *Fetal Diagn Ther.* 21(3):259-63.
137. Reyna-Villasmil, E., Torres-Cepeda, D., Peña-Paredes, E., Mejías-Montilla, J., Reyna-Villasmil, N., & González-Rodríguez, P. (2008). Efecto del citrato de sildenafil sobre el flujo sanguíneo de las arterias uterina, umbilical y cerebral media fetal en preeclámpticas. *Rev Obstet Ginecol Venez.* 68 (3), 187-194.
138. Reynolds L.P., Borowicz P.P., Vonnahme K.A., Johnson M.L., Grazul-Bilska A.T., Wallace J.M., Caton J.S. and Redmer D.A. (2005). Animal Models of Placental Angiogenesis . *Placenta*. 26,689-708.
139. Reynolds L; Redmer D. (2001). Angiogenesis in the Placenta. *Biology of Reproduction*. 64, 1033-1040.
140. Reynolds LP & Redmer DA. (1992). Growth and microvascular development of the uterus during early pregnancy in ewes. *Biol Reprod.* 47, 698-708.

- 141.Reynolds LP & Redmer DA. (1995). Utero-placental vascular development and placental function. *J Anim Sci.* 73, 1839-1851.
- 142.Ribatti D, Vacca A, Nico B, Ria R, Dammacco F. (2002). Cross-talk between hematopoiesis and angiogenesis signaling pathways. *Curr Mol Med.* 2:537-543.
- 143.Richter W. (2002). 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases class III: Members, structure, and catalytic mechanism. *Proteins- Structure Function and Genetics.* 46:278-286.
- 144.Rivas, P. C., Rodríguez-Márquez, J. M. & Hernández, A. (2006). Número de vasos sanguíneos y expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular y de la óxido nítrico sintasa endotelial e inducida en la alantoides ovina. *Revista Científica, FCV-LUZ.* 16(4), 347-352.
- 145.Roa, I., Smok, C., Prieto, R. (2012). Placenta: Anatomía e Histología Comparada. *International Journal of Morphology.* 30(4), 1490-1496.
- 146.Roberts R, Xie S, Mathialagan N. (1996). Maternal Recognition of Pregnancy. *Biol. Reprod.* 54, 294-302.
- 147.Roberts RM, Chen Y, Ezashi T, Walker AM. (2008). Interferons and the maternalconceptus dialog in mammals. *Semen. Cell. Dev. Biol.* 19 (2), 170-177.
- 148.Rodríguez-Marquez, José M.; Hernández, Aureliano; Hidalgo, Gladys. (2005). Área vascular del alantocorion ovino: un posible indicador post-mortem de sobrevivencia embrionaria. *Revista Científica.* 15(1).
- 149.Rojas M, Rodríguez A. Placenta. (1987). En *Embriología para Medicina Veterinaria.* Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
- 150.Rojo Domínguez, D. M., García Bacallao, L., Clapés Hernández, S., & Álvarez Corredera, M. S. (2003).El óxido nítrico: implicaciones fisiopatológicas en la preeclampsia. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas.* 22(2), 130-140.
- 151.Rosales-Torres AM, Guzmán Sanchez A. (2011). Importancia del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) y de sus receptores en el

- ciclo ovárico (Revisión). *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 3(1): 89-111.
152. Rosa HJD, Bryant MJ. (2003). Seasonality of reproduction in sheep. *Small Rumin. Res.* 48, 155-171.
153. Ruiz N. (2008). La Hipoxia fetal valorada mediante métodos objetivos y su relación con el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en gestaciones gemelares (tesis doctoral) España, Valencia, Universidad de Valencia.
154. Salamonsen LA, Stuchbery SJ, O'Grady CM, Godkin JD, Findlay JK. (1988). Interferon-alpha mimics effects of ovine trophoblast protein 1 on prostaglandin and protein secretion by ovine endometrial cells in vitro. *J. Endocrinol.* 117 (1), R1-R4.
155. Sammin D, Markey B, Bassett H, Buxton D. (2008). The ovine placenta and placentitis a review. *Vet Micro.*
156. Satterfield C, Bazer F, Spencer T, Wu G. (2010). Sildenafil citrate treatment enhances amino acid availability in the conceptus and fetal growth in an ovine model of intrauterine growth restriction. *J Nutr.* 140: 251-258.
157. Savidou MD, Yu CK, Harland LC, Hingorani AD and Nicolaides KH. (2006). Maternal serum concentration of soluble fms-like tyrosine kinase 1 and vascular endothelial growth factor in women with abnormal uterine artery Doppler and in those with fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol.* 195: 1668-1673.
158. Schmidt S. (2005). Morphology of peri-partal placentomes and post-partal fetal membranes in African Buffalo (*Syncerus caffer*) and comparative aspects with cattle (*Bos taurus*). Thesis of master. University Pretoria. South Africa.
159. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascitic fluid. *Science.* 219: 983-5.
160. Sgambati E, Marini M, Zappoli Thyron GD, Parretti E, Mello G, Orlando C, et al. (2004). VEGF expression in the placenta from pregnancies complicated by hypertensive disorders. *BJOG.* 111: 564-570.

161. Shaamash AH, Elsonosy ED, Zakhari MM, Radwan SH and EL-Dien HM. (2002). Placental nitric oxide synthase (NOS) activity and nitric oxide (NO) production in normal pregnancy, pre-eclampsia and eclampsia. *Gynaecol Obstet.* 72(2):123-133.
162. Shibata E, Rajakumar A, Powers RW, Larkin RW, Gilmour C, Bodnar LM, Crombleholme WR, Ness RB, Roberts JM and Hubel CA. (2005). 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. *J Clin Endocrinol Metab.* 90: 4895-4903.
163. Shibuya M. (2006). Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol.* 39: 469-478.
164. Shibuya M. (2001). Structure and function of VEGF/ VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct.* 26: 25-35.
165. Shiraishi S, Nakagawa K, Kinukawa N, Nakano H and Sueishi K. (1996). Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor in the human placenta. *Placenta.* 17: 111-121.
166. Shizukuda, Y., Tang, S., Yokota, R., Ware, J.A. (1999). Vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration and proliferation depend on a nitric oxide-mediated decrease in protein kinase C delta activity. *Circ. Res.* 85, 247- 256.
167. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* 359:843-5.
168. Skromne-Kadlubik, G.^a. (2009). Factores de crecimiento vasculares endoteliales. *Imagen Médica*, Septiembre.
169. Skromne-Kadlubik, G.^b. (2009). Factores de crecimiento radioactivos (radiosomatomedinas). *Imagen Médica*, Septiembre.
170. Song W, Jinyoung K, Fuller W, Bazer and Spencer TE. (2008). Progesterone and interferon tau regulate hypoxia-inducible factors in the endometrium of the ovine uterus. *Endocrinology.* 149(4):1926-1934.

171. Speer, D.P. (2008). Elevated asymmetric dimethylarginine concentrations precede clinical preeclampsia, but not pregnancies with small-for-gestational-age infants. *Am J Obstet Gynecol.* 198:1121-1127.
172. Spencer TE, Bazer FW. (1995). Temporal and Spatial Alterations in Uterine Estrogen Receptor and Progesterone Receptor Gene Expression during the Estrus Cycle and Early Pregnancy in the Ewe. *Biol. Reprod.* 53: 1527-1543.
173. Spencer TE, Bazer FW. (2002). Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. *Front. Biosci.* 7, 1879-1898.
174. Spencer TE, Becker W, George P, Mirando MA, Ogle TF, Bazer FW. (1995). Ovine Interferon Tau inhibits estrogen receptor up-regulation and estrogen-induced luteolysis in cyclic ewes. *Endocrinology.* 136, 4932-4944.
175. Spencer TE, Becker WC, George P, Mirando MA, Ogle TF, Bazer FW. (1995). Ovine interferon-tau regulates expression of endometrial receptors for estrogen and oxytocin but not progesterone. *Biol. Reprod.* 53, 732-745.
176. Spencer TE, Burghardt RC, Johnson GA, Bazer FW. (2004). Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83, 537-550.
177. Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC. (2004). Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reproduction.* 128, 657-668.
178. Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC. (2007). Fetal-maternal interactions during the establishment of pregnancy in ruminants. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 64:379-96.
179. Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Bazer FW. (2004). Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. *Biol. Reprod.* 71, 2-10.
180. Stacey P, Rulten S, Dapling A, and Phillips SC. (1998). Molecular cloning and expression of human cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5). *Biochem Biophys Res Commun.* 247:249-254.

- 181.Su X, Carey Y, Rose C. (2004). Ontogeny of StAR and ACTH-R Genes in Ovine Placenta. *Placenta*. 25: 658-663.
- 182.Tacheix DN. (1983). Determinación de la duración de gestación en las razas ovinas Suffolk, Dorset, Tabasco y cruza diversas para la programación de sistemas de inducción de partos en el COPEA. Tesis de Licenciatura. México, D.F. México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 183.Tammela T, Enholm B, Alitalo K and Paavonen K. (2005). The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res*. 65: 550-563.
- 184.Veikkola T, Karkkainen M, Cleasson-Welsh L, Alitalo K. (2000). Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res*. 60: 203-212.
- 185.Vonnahme KA, Wilson ME, Li Y, Rupnow HL, Phernetton TM, Ford SP, Magness RR. (2005). Circulating levels of nitric oxide and vascular endothelial growth factor throughout ovine pregnancy. *J Physiol*.
- 186.Vuorela P, Helske S, Hornig C, Alitalo K, Weich H and Halmesmaki E. (2000). Amniotic fluid - soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in preeclampsia. *Obstet Gynecol*. 95: 353-357.
- 187.Wareing M, Myers JE, O'Hara M, Baker PN. (2005). Sildenafil citrate (viagra) enhances vasodilatation in fetal growth restriction. *J Clin Endocrinol Metab*. 90:2550-2555.
- 188.Wareing M, Myers JE, O'Hara M, Kenny LC, Taggart MJ, Skillern L, Machin I, Baker PN. (2006). Phosphodiesterase-5 inhibitors and omental and placental small artery function in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol*. 127(1), 41-49.
- 189.Widmer M, Villar J, Benigni A et al. (2007). Mapping the theories of preeclampsia. *Obstet Gynecol*. 109:168-80.
- 190.Wikstrom AK, Larsson A, Eriksson UJ, Nash P, Norden-Lindeberg S and Olovsson M. (2007). Placental growth factor and soluble FMS-like tyrosine kinase-1 in early-onset and late-onset preeclampsia. *Obstet Gynecol*. 109: 1368-1374.

191. Wooding P; Burton G. (2008). Comparative placentation: structure, functions and evolution. Springer. Verlag Berlin Heidelberg. 1-291.
192. Wu G, Bazer F, Datta S, Gao H, Johnson G, Lassala A, et al. (2008). Intrauterine growth retardation in livestock: implications, mechanisms and solutions. *Arch Tierz Dummerstorf*. 51: 4-10.
193. Wu G, Bazer F, Wallace J, Spencer T. (2006). Intrauterine growth retardation: Implications for the animal sciences. *J Anim Sci*. 84: 2316-2337.
194. Yallampalli C, Garfield R. (1993). Inhibition of nitric oxide synthesis in rats during pregnancy produces signs similar to those of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 169:1316-1320.
195. Yamakawa M, Liu LX, Date T, Belanger AJ, Vincent KA, Akita GY, Kuriyama T, Cheng SH, Gregory RJ, Jiang C. (2003). Hypoxia-inducible factor-1 mediates activation of cultured vascular endothelial cells by inducing multiple angiogenic factors. *Circulation Research*. 93:664-73.
196. Yuasa K, Kotera J, Fujishige K, Michibata H, Sasaki T, and Omori K. (2000). Isolation and characterization of two novel phosphodiesterase PDE11A variants showing unique structure and tissue-specific expression. *J Biol Chem*. 275:31469-31479.
197. Zarco, L., Stabenfeldt, J., Basu, S., Bradford, G.E. and Kindahl, H. (1988). Modification of prostaglandin F2 alfa synthesis and release in the ewe during the initial establishment of pregnancy. *J. Reprod. Fert.*83: 527-536.
198. Zhu, K. Q., Engrav, L. H., Armendariz, R., Muangman, P., Klein, M. B., Carrougher, G. J. (2005). Changes in VEGF and nitric oxide after deep dermal injury in the female, red Duroc pig-further similarities between female, Duroc scar and human hypertrophic scar. *Burns*. 31, 5-10.