



Cuantificación de células endoteliales que expresan VEGF, iNOS y eNOS en el endometrio ovino a los 20, 28 y 35 días de la gestación[¶]

Revista
Colombiana de
Ciencias
Pecuarias

Quantification of endothelial cells expressing VEGF, iNOS and eNOS in the ovine endometrium at 20, 28 and 35 days of gestation

Piedad C Rivas¹, MV; José M Rodríguez², MV, MS, Dr. Sci; Aureliano Hernández^{1*}; DMVZ, MS, PhD

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

²Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

ahernandezv@unal.edu.co

(Recibido: 26 octubre, 2006; aceptado: 2 agosto, 2007)

Resumen

El número de células que expresaron el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) y dos isoformas de la Óxido Nítrico Sintasa, endotelial (eNOS) e inducida (iNOS), se calculó en los vasos sanguíneos del endometrio ovino a los 20, 28 y 35 días de gestación, en las áreas uterinas correspondientes a la ubicación del embrión, muy cerca, cerca y alejadas de él, usando inmunohistoquímica. El número de células endoteliales que expresaron VEGF, iNOS y eNOS disminuyó concomitantemente con el avance de la gestación y los valores correspondientes fueron cada vez menores, a medida que la zona en la que se hizo la cuantificación, estaba más alejada del embrión. La cantidad de células que expresaron VEGF fue mayor que aquella estimada para las NOS, siendo superior la observada para eNOS que para iNOS. Como un hallazgo complementario, se reporta expresión de VEGF en el trofoblasto. De acuerdo con los resultados obtenidos, las tres moléculas expresadas en el endotelio de los vasos endometriales, actúan independientemente o en sinergia para el desarrollo vascular uterino durante el lapso de la implantación que abarcó este estudio. Posiblemente hay otras moléculas que participan en el desarrollo vascular endometrial, después del día 35 de la gestación.

Palabras Clave: endometrio, endotelio, eNOS, gestación, iNOS, oveja, VEGF.

Summary

Using immunohistochemistry, the number of endothelial cells of the ovine endometrium, expressing vascular endothelial growth factor (VEGF) and two isoforms of nitric oxide synthase, endothelial (eNOS) and induced (iNOS) was calculated, at 20, 28 and 35 d of gestation. Four uterine zones corresponding to embryo localization, very near, near and far from it, were established. The number of immunoreactive

[¶] Para citar este artículo: Rivas P, Rodríguez JM, Hernández A. Cuantificación de células endoteliales que expresan VEGF, iNOS y eNOS en el endometrio ovino a los 20, 28 y 35 días de la gestación Rev Col Cienc Pec 2007; 20:280-287.

* Autor para la solicitud de separatas y envío de correspondencia: Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Colombia. E-mail: ahernandezv@unal.edu.co

cells expressing all studied molecules was highest at the embryo location zone, intermediate values were obtained in the correspondent uterine zones and lowest in the more distant one. The number of cells expressing VEGF was higher than the correspondent value for eNOS and the latter was higher than the value for iNOS. The expression of VEGF in the trophoblast is reported as an incidental finding. Based on present results, it appears that VEGF, iNOS and eNOS act synergically or in an independent manner to promote vascular development. It is feasible that another molecules act in the same way, after the 35d of gestation.

Key words: *endometrium, endothelium, eNOS, ewe, gestation, iNOS, VEGF.*

Introducción

La implantación comienza con la fijación del blastocisto en el útero y termina con la formación de la placenta ovina definitiva (8). Antes del día 30 de la gestación, cuando aún no está desarrollada la placenta y no ha culminado la implantación ocurren muchas pérdidas embrionarias (31). El proceso de implantación es lento y gradual en la oveja, e involucra modificaciones del epitelio uterino y del trofoblasto. Para el día 16 de gestación la implantación se ha iniciado (7, 8) en las zonas cercanas al embrión y el trofoblasto se caracteriza morfológicamente por la presencia de 2 ó 3 capas de células, adherido al epitelio uterino, tejido que se ha modificado pasando de epitelio pseudoestratificado cilíndrico o cilíndrico simple, a uno de tipo cúbico o plano simple (7, 11, 24). Sin embargo, los placentomas no se desarrollan completamente en toda la extensión de la placenta, sino después del día 60 de la gestación (8). Por ende, el intercambio de nutrientes y particularmente de oxígeno en la interfase materno-fetal depende en gran parte del flujo sanguíneo y desarrollo vascular uterino durante la implantación.

En trabajos anteriores se estableció que la densidad capilar subendotelial en el útero ovino, aumenta durante los seis primeros días de la implantación y es mayor en las zonas cercanas al embrión, lo cual plantea posibles diferencias fisiológicas (26). En estudios hechos en ovejas entre los días 12 y 30 post-apareamiento, se encontró que el desarrollo vascular del útero aumenta (22) y que el VEGF está presente en el útero de la oveja durante la gestación temprana (23).

En ratones a los que se les eliminaron los genes para la expresión de VEGF, hay deficiencia vascular en la alantoides (5), lo cual indica la

importancia de este factor en el desarrollo vascular. El VEGF es un mitógeno potente y específico de las células endoteliales vasculares y promueve la neovascularización *in vivo* (14). Además, regula el crecimiento de los vasos sanguíneos y de la permeabilidad de los mismos (13). Así mismo, tiene una acción de regulación alta del óxido nítrico (NO) producido en las células endoteliales (21). En la placenta ovina, la NOS constitutiva está compuesta principalmente por eNOS y en una pequeña parte por la NOS neuronal (18). La actividad de la NOS se aumenta durante la gestación temprana en la oveja (16). Así mismo, la síntesis de óxido nítrico (NO), es mayor en la gestación que durante el ciclo estral (30). En ratones, la progesterona aumenta la angiogénesis uterina parcialmente mediada por el VEGF (28), lo cual podría suceder también en la oveja. Sin embargo, aún no se conoce si hay o no diferencias en la expresión de VEGF y de las iNOS y eNOS en el útero ovino durante la implantación embrionaria en la oveja. Así mismo, si tal expresión varía cuantitativamente en las diferentes zonas uterinas con el avance de la gestación. Este trabajo tuvo como objetivo establecer posibles variaciones en cuanto al número de células que expresan VEGF, iNOS y eNOS en el endometrio ovino, en tres edades de la gestación y en distintas zonas endometriales, cercanas o alejadas del embrión.

Materiales y métodos

En el estudio se utilizaron 12 hembras ovinas mestizas de historia reproductiva conocida, clínicamente sanas, con mínimo un parto y en edad reproductiva. Los animales, ubicados en la ciudad de Bogotá, Colombia, se alimentaron con pasto cortado ofrecido tres veces al día, sal mineralizada a voluntad, concentrado comercial a razón de 100 g/animal/día y agua *ad libitum*.

Muestra

Tres grupos de cuatro ovejas con gestaciones simples cada uno, se distribuyeron en tres edades de gestación: 20, 28 y 35 días. La detección del celo se realizó empleando un macho caudoepidectomizado y las ovejas se aparearon con machos reproductores mestizos luego de la detección del celo; el día posterior a la presentación del celo se tomó como el primero de la gestación. Al llegar a los días señalados, se realizó confirmación de la preñez con un equipo de ultrasonografía dotado con un transductor de 5MHz (marca Aloka, modelo: SSD-210DXII, e impresora SONY modelo: UP-87 OMD). El sacrificio de los animales se realizó por degüello previa sedación con Xilazine (0.5 mg/kg de peso). Luego se fijó el útero de cada animal por perfusión con una solución de formalina al 10% de pH 7.4, a través de las arterias uterinas media y vaginal. Cortes longitudinales de los úteros, cada uno de aproximadamente 2 cm ubicados en las siguientes cuatro zonas: 1) en el sitio de ubicación del embrión, 2) contigua a la anterior, denominada muy cercana al embrión, 3) adyacente al área denominada cerca al embrión, y 4) en el cuerno contralateral, llamada alejada del embrión. Entonces, las zonas 1, 2 y 3, se estaban en el cuerno ipsilateral.

Inmunohistoquímica

Las muestras uterinas fueron sometidas a imbibición en parafina y se obtuvieron cortes de 5 µm de grosor, para la detección posterior de las moléculas por inmunohistoquímica, empleando los siguientes anticuerpos: 1) anticuerpo contra el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (monoclonal N° 26503.11), 2) anticuerpo contra la Oxido Nítrico Sintasa endotelial (monoclonal N° 3893), y 3) anticuerpo contra la Oxido Nítrico Sintasa inducible (monoclonal N° 7782) (Sigma Chemical Company, St Louis Missouri). Para las pruebas inmunohistoquímicas se usó la técnica Avidina-Biotina Peroxidasa (3): se obtuvieron cortes seriados, uno para realizar el procedimiento de inmunohistoquímica, y otro para el control de la prueba. A este último, se le aplicó el mismo tratamiento que al control positivo con excepción de la adición del anticuerpo primario; en su lugar se aplicó tampón tris-salino. En esta prueba se utilizó un corte de piel fetal ovina para observar

el epitelio de revestimiento como control negativo (véase Figura 1) (13). Como control positivo se utilizaron cortes de la arteria aorta fetal ovina (3).

La viabilidad de los embriones se realizó determinando que los conceptus no presentaran membranas amarillentas y ausencia de vasos sanguíneos alantoideos (4, 8). Las células consideradas positivas fueron localizadas por demostración de la proteína anti-VEGF, anti-iNOS y anti-eNOS. La proteína se manifiesta con una coloración pardo-rojiza de variada intensidad. El número de células del endometrio con marcación positiva al VEGF y a cada una de las dos isoformas de NOS, se determinaron en 10 campos ópticos escogidos al azar, observados con el objetivo de 40X con un microscopio de luz; todas las células endoteliales del endometrio se contaron. Para evitar sesgos, al llevar a cabo las cuantificaciones, se asignó a cada muestra un número, cuya procedencia era desconocida para el evaluador.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron usando estadística descriptiva para el número de células que expresaban VEGF, iNOS y eNOS, en las variables área uterina para día de implantación (Minitab, Inc., State College, PA, USA, 1989). Adicionalmente, se realizó un análisis de frecuencias usando el procedimiento *FREQ* (Instituto SAS, Cary, NC, USA, 1985) para determinar posibles diferencias entre las variables número de células productoras del VEGF y de NOS en las dos isoformas mencionadas y los factores subsectores histológicos y días de la implantación.

Resultados

En todos los cortes histológicos de úteros de las diferentes ovejas y en las tres edades de gestación estudiadas, se pudo evidenciar la expresión del VEGF y de las dos isoformas de NOS consideradas (véanse Figuras 2-4). En el caso de marcación positiva, hubo una reacción en el citoplasma celular de color pardo-rojiza de variada intensidad. La inmunomarcación para las tres moléculas estudiadas, se observó en células del endotelio de los vasos endometriales. En algunas preparaciones en las cuales estaba presente el corion o el alantocorion, se

pudo observar una marcación positiva en el corion para el VEGF, así como en células de la sangre intravasculares, de las glándulas endometriales y en algunas presentes en el tejido conectivo de

la propia-submucosa uterina. En ninguno de los controles de la prueba se observó tinción positiva (véase Figura 1).

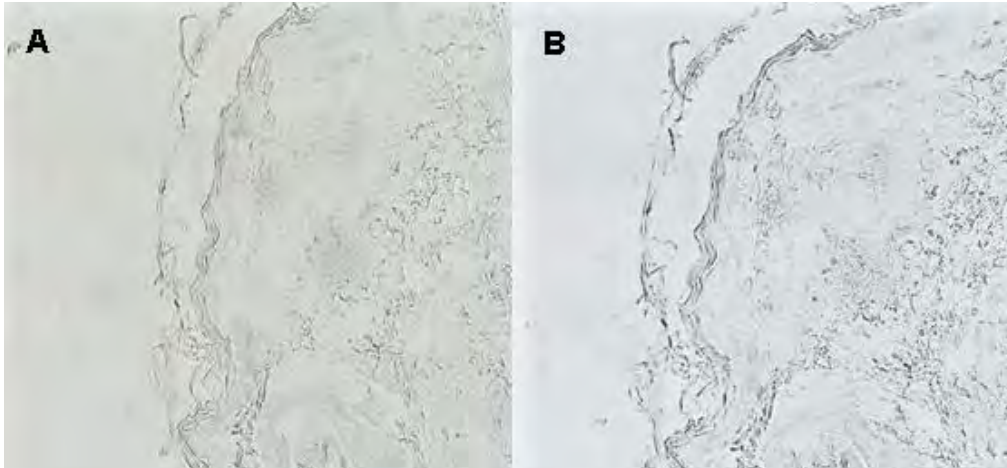


Figura 1. Microfotografía de un corte de piel fetal ovina, utilizado como control negativo para detectar la presencia de VEGF y las dos isoformas de NOS, mediante la prueba de inmunohistoquímica. A: corte al que se le adicionó el anticuerpo primario. B: corte al que en vez del anticuerpo primario se le adicionó tampón tris salino (control de la prueba). Aumento 40X.

Para los tres factores estudiados, se observó que a medida que avanzaba la gestación, disminuía la cantidad de células reactivas usando las pruebas inmunohistoquímicas, pero no se encontraron diferencias al comparar el número de esas células en animales de un mismo día de gestación ($p > 0.05$), razón por la cual los datos se presentan de manera conjunta para cada edad de preñez.

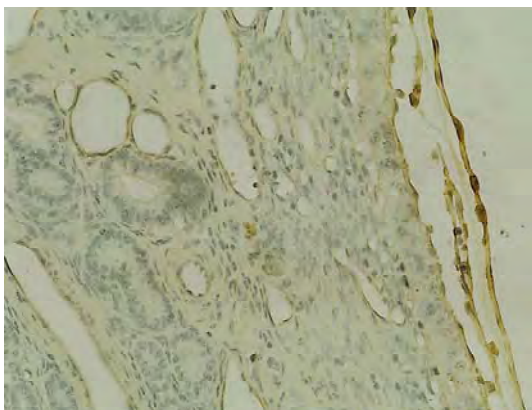


Figura 2. Corte de útero ovino en el día 20 de la gestación, para la inmunodetección de eNOS. Nótese la marcación tanto en el epitelio uterino como en el trofoblasto, aunque en menor cantidad. Aumento original 40X.

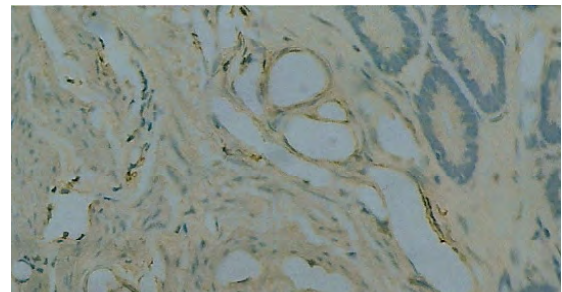


Figura 3. Corte de útero ovino en el día 20 de la gestación, para la inmunodetección de eNOS. Nótese la marcación en el endotelio de los vasos endometriales. Aumento original 40X.

Entre los valores obtenidos del número de células reactivas al VEGF y a las iNOS y eNOS, en el día 28 de gestación hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) con los obtenidos para las otras edades y al comparar los valores correspondientes a marcaciones de los tres factores entre sí (véanse Tablas 1-3). El número de células que mostraron marcación el día 35, fue menor que el obtenido para las otras dos edades de gestación. Igualmente, se encontraron diferencias significativas entre el número de células reactivas al VEGF en relación con los correspondientes valores para iNOS y eNOS ($p < 0.05$) (véanse Tablas 1-3).

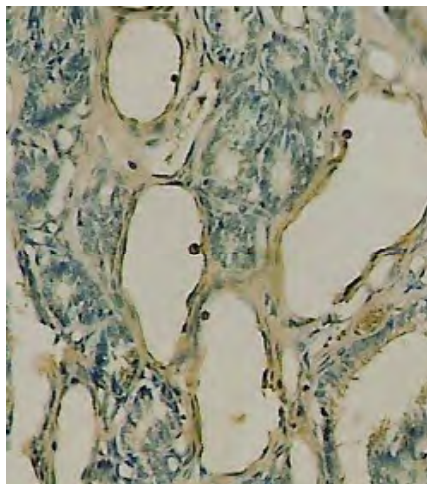


Figura 4. Corte de útero ovino en el día 20 de la gestación, para la inmunodetección de iNOS. Nótese la marcación en el endotelio de los vasos endometriales. Aumento original 40X.

Tabla 1. Número de células reactivas a VEGF, en los días 20, 28 y 35 de la gestación, en diferentes zonas del endometrio ovino.

Zonas uterinas/edad de gestación	Día 20	C de variación	Día 28	C de variación	Día 35	C de variación
Área 1. En el sitio de ubicación del embrión	72.8	0.14 ^a	40.7	0.16 ^a	25.7	0.17 ^b
Área 2. Muy cerca del embrión	68.2	0.14 ^a	31.7	0.17 ^a	20.7	0.18 ^a
Zona 3. Cerca del embrión	41.5	0.16 ^a	26.3	0.19 ^a	17.9	0.23 ^a
Zona 4. Lejos del embrión	16.7	0.23 ^b	12	0.25 ^b	10.6	0.26 ^b

Los superíndices con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) C= coeficiente.

Tabla 2. Número de células que expresan iNOS, en los días 20, 28 y 35 de la gestación, en diferentes zonas del endometrio ovino

Zonas uterinas/edad de gestación	Día 20	C de variación	Día 28	C de variación	Día 35	C de variación
Área 1. En el sitio de ubicación del embrión	48.9 ^a	0.17	18.4	0.22 ^a	8.6	0.27 ^a
Área 2. Muy cerca del embrión	40.9 ^a	0.18	14.9	0.24 ^a	7.7	0.27 ^a
Área 3. Cerca al embrión	30 ^b	0.22	10.4	0.27 ^b	6.5	0.29 ^b
Área 4. Lejos del embrión	10 ^b	0.25	6.5	0.29 ^b	4	0.29 ^b

Los superíndices con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) C= coeficiente.

Tabla 3. Número de células que expresan eNOS, en los días 20, 28 y 35 de la gestación, en diferentes zonas del endometrio ovino

Zonas uterinas / Edad de gestación	Día 20	C de variación	Día 28	C de variación	Día 35	C de variación
Área 1. En el sitio de ubicación del embrión	53.1	0.16 ^a	20.6	0.24 ^a	9.4	0.25 ^a
Área 2. Muy cerca del embrión	47.2	0.17 ^a	16.9	0.24 ^a	7.6	0.26 ^a
Área 3. Cerca del embrión	35.9	0.18 ^a	12.2	0.25 ^a	6.9	0.29 ^b
Área 4. Lejos del embrión	13.7	0.25 ^b	7	0.29 ^b	4	0.29 ^b

Los superíndices con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). C = coeficiente

Discusión

El número de células endoteliales que expresaron VEGF y las NOS fue menor en las zonas uterinas más lejanas del embrión, en comparación con las más cercanas, lo cual sugiere diferencias en la activación de los mecanismos de formación de vasos sanguíneos, de acuerdo con la zona uterina. Los hallazgos del presente estudio coinciden, en parte, con la mayor densidad capilar endometrial cerca al embrión en comparación con las zonas más alejadas del mismo encontrada previamente (26) y con lo reportado en un estudio complementario al presente, en el cual, el área capilar subendotelial aumentó cuantitativamente en el endometrio de las mismas ovejas empleadas en el presente estudio (25). Lo anterior explicaría la participación del VEGF y las NOS en el proceso de desarrollo vascular en el útero de la oveja durante el periodo de la implantación del conceptus.

La expresión del VEGF en el endometrio durante la preñez temprana, implica que dicha molécula contribuye a la modulación del crecimiento vascular. Esta acción podría ser controlada por el trofoblasto, si la molécula es absorbida por el útero, dado que en este tejido también se observó expresión de VEGF. En el humano dicha molécula también se expresa en el trofoblasto (27). Es interesante anotar que en estudios previos se ha encontrado un mayor desarrollo del trofoblasto cerca del embrión, que en las zonas alejadas (7, 11), lo cual puede estar relacionado con el mayor desarrollo vascular observado en estudios anteriores en las zonas cercanas al embrión y al mayor número de células que expresan VEGF, iNOS y eNOS en el presente estudio. En este sentido, se reportó que el VEGF induce la expresión de iNOS y eNOS (15).

La disminución del número de células que expresan VEGF, iNOS y eNOS en el endometrio encontrada en el presente trabajo, entre los 20 y los 35 días de gestación, podría indicar una acción sinérgica entre las moléculas estudiadas, en el desarrollo vascular.

Además, es factible que con el avance de la gestación y en virtud de que los procesos de desarrollo vascular uterino continúan después del día 35, el aumento de la densidad vascular depende de la acción de otras moléculas, tales como las ciclooxigenasas-2 (20), el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento placentario (2) y el factor estimulador de la formación de colonias (10). En el trofoblasto humano, la angiopoyetina-1 tuvo una alta expresión durante la segunda mitad de la gestación (29).

En el presente estudio solamente se tomaron en cuenta las células endoteliales que expresan VEGF, la iNOS y la eNOS, pero hay otras células que podrían estar participando en el desarrollo vascular uterino durante la gestación, tales como los neutrófilos intravasculares que en los humanos producen VEGF (6). Así mismo, los eosinófilos que están presentes en cantidades importantes en el útero de la oveja durante la implantación (11), contienen dos isoformas de VEGF (12) y hay eosinófilos que expresan la isoforma neuronal de la NOS (19). En el trabajo aquí presentado no se hace alusión a otras células que dieron una coloración positiva para VEGF las cuales podrían representar neutrófilos o eosinófilos intra y extra vasculares. La co-expresión de eNOS y VEGF, también se halló en los vasos sanguíneos del cuerpo lúteo del ovario de la oveja, posiblemente bajo la influencia de la progesterona (9), lo cual podría ocurrir también en el útero, en donde los cambios en la actividad de las NOS están bajo la influencia de la progesterona (1).

Con base en los análisis del presente trabajo se infiere que en los vasos sanguíneos endometriales de la oveja durante la implantación embrionaria, el VEGF y las NOS inducible y endotelial son moléculas que promueven, en sinergia, o separadamente la neo-formación de vasos sanguíneos.

Agradecimientos

La presente investigación fue financiada por la Universidad Nacional de Colombia, la Universidad del Zulia (Venezuela) y Colciencias (Colombia).

Referencias

1. Ali M, Buhimschi I, Chwalisz K, Garfield RE. Changes in expresión of nitric oxide synthase isoforms in rat uterus during pregnancy and parturition. *Mol Hum Reprod* 1997; 3:995-1003.
2. Athanassiades A, Lala P. Role of placenta growth factor (PlGF) in human extravillous trophoblast proliferation, migration and invasiveness. *Placenta* 1998; 17:545-555.
3. Boenish T. Hand book of immunoperoxidase staining methods. Dakocytomation. Online version. Dako Laboratories. Carpinteria, Ca USA 2001. p 26-32.
4. Boshier DP. Histological examination of serosal membranes in studies of early embryonic mortality in the ewe. *J Reprod Fert* 1968; 15:81-86.
5. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995; 376:66-70.
6. Gargett CE, Rogers PAW. Human endometrial angiogenesis. *Reproduction* 2001; 121:181-186.
7. Gaviria M, Hernández A. Morphometry of implantation in sheep. I. Trophoblast attachment, modification of the uterine lining, conceptus size and embryo location. *Theriogenology* 1994; 41:1139-1149.
8. Guillomot M. Cellular interactions during implantation in domestic ruminants. *J Reprod Fertil* 1995; 49:39-51.
9. Grazul-Blizka AT, Chainarong N, Jonson ML, Arnold DA, Reynolds LP, *et al.* Expression of endothelial nitric oxide synthase in the ovine ovary throughout the estrous cycle. *Reproduction* 2006; 132:579-587.
10. Hamilton G, Lysiak J, Watson A, Lala P. Autocrine growth stimulatory role of CSF-1 for the first trimester human trophoblast. *Am J Reprod Immunol* 1995; 33:316.
11. Hernández A. The development of the extremities of the placenta in the domestic sheep. MS dissertation. University of Bristol. England. 1971.
12. Horiuchi T, Weller PF. Expression of vascular endothelial growth factor by human eosinophils: upregulation by granulocyte/colony-stimulating factor and interleukin-5. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17:70-77.
13. Jakeman L, Winer J, Bennett G, Altar A. Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. *J Clin Invest* 2001; 89:244-253.
14. Jiang L, Perrella M, Tsai J. Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin -1B in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1995; 270:308-312.
15. Kroll J, Waltengberger J. VEGF-A induces expression of ENOS and INOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 252:743-746.
16. Kwon H, Wu G, Meininger CJ, Bazer FW, Spencer TE. Developmental changes in nitric oxide synthesis in the ovine placenta. *Biol Reprod* 2004; 71:901-908.
17. Laila P, Hamilton G. Growth factors, proteases and protease inhibitors in the maternal-fetal dialogue. *Placenta* 1996; 17:545-555.
18. Magness RR, Shaw CE, Phernetton TM, Zheng J, Bird IM. Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. II. Pregnancy effects on NO synthase expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1997; 272: H1730-H1740.
19. Maruo K, Kayashima KI, Ono T. Expression of neuronal nitric oxide synthase in dermal infiltrated eosinophils in eosinophilic pustular folliculitis. *British J Dermatol* 1999; 140:417-423.
20. Matsumoto H, Ma W, Daikoku T, Zhao X, Paria B, *et al.* Cyclooxygenase-2 differentially directs uterine angiogenesis during implantation in mice. *J Biol Chem* 2002; 277:29260-29267.
21. Parenti A, Morbidelli L, Cui XL, Douglas JG, Hood JD, *et al.* Nitric oxide is an upstream signal for vascular endothelial growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase1/2 activation in postcapillary endothelium *J Biol Chem* 1998; 272:4220-4226.
22. Reynolds LP, Redmer, DA. Growth and microvascular development of the uterus during early pregnancy in ewes. *Biol Reprod* 1992; 47:698-708.
23. Reynolds LP, Redmer DE. Angiogenesis in the placenta. *Biol Reprod* 2001; 64:1033-1040.
24. Rivas C, Rodríguez J, Hernández A. Estudio histomorfométrico del alantocorion ovino durante la implantación embrionaria. *Rev Científica FCV-LUZ* 2002; 12:291-295.
25. Rivas PC. Número de capilares y de células endoteliales del endometrio ovino que expresan VEGF, iNOS y eNOS a los 20, 28 y 35 días de la gestación en la oveja. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 2006. 50p.
26. Sánchez JA, Rodríguez-Márquez JM, Hernández A. Área capilar sub-epitelial en el endometrio ovino en los días 0 y 14 del ciclo estral y en los 14, 20 y 24 días de gestación. *Rev Científica FCV-LUZ* 2001; 11:69-74.
27. Shore V, Wang T, Wang L, Torry R, Caudle M, *et al.* Vascular endothelial growth factor, placental growth factor and their receptors in isolated human trophoblast. *Placenta* 2005; 28:657-665.
28. Walter LM, Rogers PAW, Girling JE. The role of progesterone in endometrial angiogenesis in pregnant and ovariectomised mice. *Reproduction* 2005; 129: 765-777.

29. Wulff C, Wilson H, Dickson SE, Wiegand SJ, Fraser HM. Hemochorial placentation in the primate: expression of endothelial growth factor, angiopoietins, and their receptors throughout pregnancy. *Biol Reprod* 2002; 66:802-8012.
30. Yi FX, Magness RR, Bird IM. Simultaneous imaging of calcium [Ca²⁺] and intracellular NO production in freshly isolated uterine artery endothelial cells: effects of ovarian cycle and pregnancy. *Am J Physiol Reg Integr Comp Physiol* 2005; 288:R140-R148.
31. Zheng J, Redmer DA, Killilea SD, Reynolds LP. Characterization of heparin-binding endothelial mitogens produced by the ovine endometrium during early pregnancy. *Biochem Cell Biol* 1998; 76:89-96.