

# Immunolocalización del sistema Angiopoyetina-1/Tie-2 en placentas de cabras

## Immunolocalization of Angiopietin-1/ Tie-2 system in goat placentas

MURA, N<sup>1</sup>; DÍAZ, T<sup>1</sup>; GROSSO, MC<sup>2</sup>; FLORES BRACAMONTE, MC<sup>1</sup>; CONIGLIO, V<sup>3</sup>; MERKIS C<sup>4</sup>; BOZZO, A<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Biología Celular y Embriología General. <sup>2</sup>Histología. <sup>3</sup>Nutrición Animal. <sup>4</sup>Área de Microscopía Electrónica. Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina. CP: 5800

### RESUMEN

La Angiopoyetina-1 y su receptor Tie-2 participan en el proceso de angiogénesis y de este modo tienen un rol fundamental en el desarrollo y el crecimiento fetal, afectando la supervivencia y el crecimiento neonatal. El objetivo de este estudio fue describir los cambios estructurales y determinar la localización del sistema Ang-1/Tie-2 en placentas caprinas en diferentes estadios gestacionales. Se utilizaron cortes histológicos provenientes de placentas de 50, 100 y 135 días de gestación, que fueron inmunomarcados con un anticuerpo anti-Ang-1 y su receptor con anti-Tie-2. En placentas de 50 y 100 de gestación la marcación con Ang-1 fue intensa en el trofoblasto y débil en el epitelio materno y vasos fetales. En contraste, en placentas de 135 días de gestación, la afinidad fue intensa sobre el epitelio materno y débil sobre el tejido fetal y endotelial. El receptor Tie-2 se identificó en las células endoteliales de capilares fetales y maternos, y también en el epitelio trofoblástico en los períodos analizados. Estos resultados indicarían que el sistema Angiopoyetina-1/Tie-2 actúa por un mecanismo de acción autocrino y paracrino sobre la angiogénesis, complementariamente al principal factor angiogénico, factor de crecimiento del endotelio vascular.

**Palabras clave:** (cabras), (placenta), (angiogénesis), (Angiopoyetina-1), (Tie-2)

Recibido: 27-12-18

Aceptado: 09-05-19

Correspondencia *e-mail*: Andrea Bozzo abozzo@ayv.unrc.edu.ar

## SUMMARY

Angiopoietin-1 and Tie-2 receptor participate in the process of angiogenesis and thus plays a critical role in fetal growth and development, affecting neonatal survival and growth. The objective of this study was to describe the structural changes and determine the location of the Angiopoietin-1/Tie-2 system in goat placentas at different gestational stages. Histological sections from placentas of 50, 100 and 135 days of gestation were used. This were immunolocalization with an anti-Ang-1 antibody and with anti-Tie-2. Ang-1 was evidenced in the trophoblastic epithelium in intense form in placentas of 50 and 100 days of gestation and in a weaker form in the maternal epithelium and fetal blood vessels. In contrast, in placentas of 135 days of gestation, the immunolocalization was intense on the maternal epithelium and weak on the fetal and endothelial tissue. The Tie-2 receptor was located in the endothelial cells of fetal and maternal capillaries and in the trophoblastic epithelium in the periods analyzed. This would indicate that the Angiopoietin-1/Tie-2 system acts by an autocrine and paracrine mechanism of action on angiogenesis, in addition to the main angiogenic factor, vascular endothelial growth factor.

**Keywords:** (goats), (placenta), (angiogenesis), (Angiopoietin-1), (Tie-2)

## INTRODUCCIÓN

El crecimiento y la supervivencia del feto durante su desarrollo dependen de la placenta, la cual se compone de tejidos maternos y fetales. El componente fetal está representado por el corion, que posteriormente se va a unir con el alantoides, el cual le proporciona la vascularización y forma la placenta definitiva corionalantioidea<sup>24</sup>. Morfológicamente la placenta de las cabras es considerada cotiledonaria debido al desarrollo de áreas restringidas de interdigitación entre el tejido materno y fetal, denominadas placentomas<sup>22</sup>. Histológicamente, es una placenta sinepiteliocorial con células gigantes que migran desde el epitelio coriónico para alcanzar el epitelio endometrial donde se fusionan y forman sincitios; originados tanto por células maternas como embrionarias/fetales<sup>3</sup>. En el tejido placentario se desarrolla una red vascular extensa que es fundamental para garantizar la supervivencia embrionaria<sup>12, 18, 22, 26</sup>. A medida que la angiogénesis progresa en la unidad fetomaterna, se produce un incremento del flujo sanguíneo uterino y umbilical<sup>19, 27</sup>. De este modo, las condiciones que afectan el crecimiento de la red vascular tales como los niveles nutricionales inadecuados, el aumento en el número de fetos, las características genotípicas

y/o el estrés ambiental pueden provocar una disminución en la angiogénesis placentaria<sup>21, 28</sup>. Durante la gestación, las Angiopoyetinas (Ang) se producen principalmente en la placenta y actúan complementariamente al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) promoviendo la angiogénesis placentaria<sup>6, 8, 15</sup>. El sistema Angiopoyetina-1 y su receptor Tie-2 (Ang-1/Tie-2) desempeña un rol primordial en los endotelios interviniendo en la regulación de la supervivencia celular, la maduración y promoviendo su estabilidad mediante el reclutamiento y la interacción con las células peri-endoteliales<sup>1, 14, 16</sup>. Además, potencia la función de la barrera endotelial favoreciendo las adhesiones celulares. Durante el desarrollo vascular, controla el diámetro de los vasos y en el post-desarrollo, actúa como un inhibidor de la permeabilidad vascular y de la apoptosis endotelial, favoreciendo de este modo, la supervivencia vascular<sup>9</sup>. Hay evidencias que los ratones deficientes en Ang-1/Tie-2 presentan graves defectos vasculares que conducen a la muerte embrionaria<sup>5, 23</sup>. Si bien existen algunos trabajos sobre el rol que desempeña el sistema Ang-1/Tie-2 en placentas humanas, actualmente no se encuentra

bibliografía disponible respecto a su localización y funcionalidad en placentas caprinas. El objetivo de este estudio fue describir los cambios estructurales y determinar la localización del sistema Ang-1/Tie-2 en placentas de cabras a lo largo de la gestación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 15 cabras adultas mayores de dos años, libres de enfermedades infecciosas, con gestaciones previas. Los animales tuvieron acceso al alimento y al agua *ad libitum*. Se efectuó la detección del celo por observación directa una vez por día y el servicio por monta natural. El diagnóstico de gestación se realizó a los 25-30 días posteriores al servicio, seleccionando las cabras con preñeces simples. Los animales se sacrificaron a los 50 (n=5), 100 (n=5) y 135 (n=5) días de gestación y a partir de una incisión en el abdomen por la línea media se extrajeron los úteros grávidos. Cada cuerno uterino se incidió a lo largo del borde antimesometrial y el feto fue removido. De cada útero se obtuvieron diez placentomas al azar y se fijaron en formol fosfato tamponado (pH 7,5). Por medio de la técnica histológica convencional se obtuvieron cortes delgados (4 µm) que fueron coloreados con Hematoxilina Eosina (H/E) para identificar los cambios estructurales de la placenta en los distintos tiempos gestacionales y para la realización de inmunohistoquímica (avidina-estreptavidina-peroxidasa). Se utilizaron los anticuerpos anti Ang-1 (Santa Cruz Biotechnology Inc. USA, 1/50) y anti Tie-2 (Santa Cruz Biotechnology Inc. USA, 1/50) para determinar la localización de Ang-1 y su receptor Tie-2. La adquisición de las imágenes se realizó con una cámara digital AxioCam ERc 5s adosada a un microscopio (Carl Zeiss, Alemania) y se procesaron con el software AxioVision Release 4.6.3. Para la cuantificación de Ang-1 se evaluaron 5 campos al azar del tejido placentario por animal, con un aumento de 200 X. Los resultados obtenidos se expresaron en forma semicuantitativa, en función de una escala elegida por la intensidad de marcación detectada en la técnica: (-): negativo, (+): débil, (++) : moderado, (+++) : intensa. Se evaluó la distribución de la intensidad de

marcación por medio del valor High Score. El mismo se obtuvo a través de la sumatoria de los porcentajes de tejido placentario marcados a cada nivel de intensidad y multiplicado por el ponderado para esa intensidad de marcación, de la siguiente manera: HS:  $\sum Pi (i + 1)$  donde: i: intensidad de marcación. Pi: porcentaje de células para cada intensidad de marcación<sup>4</sup>.

Los valores fueron determinados por dos investigadores a diferentes tiempos, se calculó su promedio y luego se realizó un ANOVA con el software InfoStat<sup>7</sup> para evaluar la dependencia de Ang 1 en relación al estadio gestacional.

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

## RESULTADOS

### Estructura placentaria a lo largo de la gestación

El estudio morfológico de las placentas de 50, 100 y 135 días de gestación con la coloración de H/E reveló que a medida que la gestación progresa, las placentas desarrollan una estructura más compleja. En todas las edades gestacionales estudiadas se evidenció que el tejido caruncular emite tabiques que se proyectan hacia el tejido fetal y forma criptas que están invadidas por vellosidades fetales. Estos tabiques se ramifican y aumentan la superficie de contacto con el tejido cotiledonario.

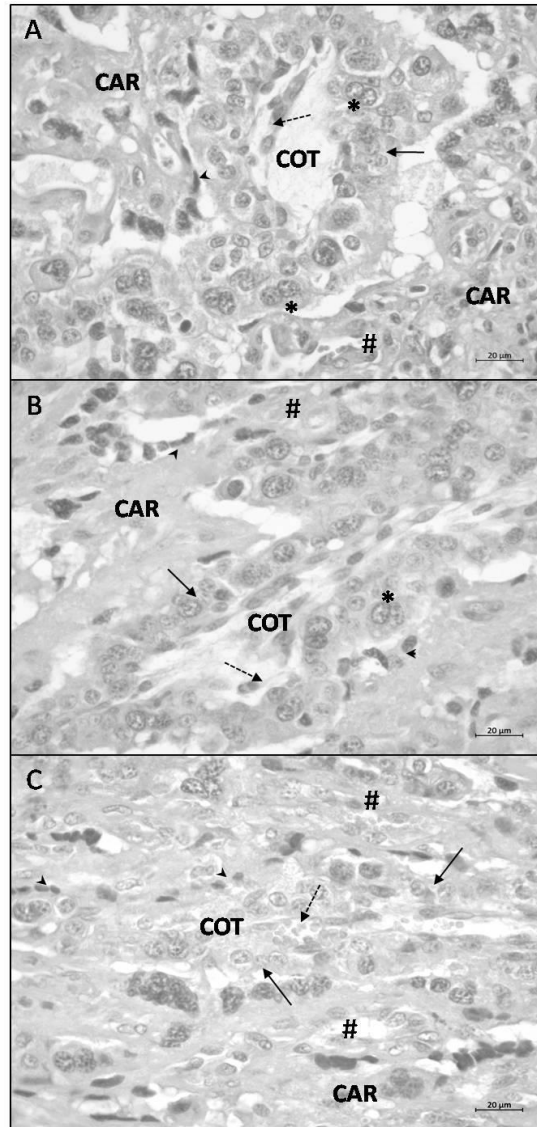
En los placentomas de 50 y 100 días el epitelio materno, ubicado en contacto con el epitelio fetal, es delgado y está constituido principalmente por las células mononucleadas (CMN) que se intercalan con las células multinucleadas. Las primeras tienen forma cúbica y presentan un núcleo de color claro con cromatina laxa, en cambio, las multinucleadas, también denominadas sincitios, presentan un número variado de núcleos con predominio de cromatina condensada y con escaso citoplasma. En el tejido conectivo se observó la presencia de vasos sanguíneos de diferente tamaño (Figura 1A y B).

El epitelio fetal cotiledonario, es de apariencia pseudoestratificado y está constituido por CMN que se intercalan con células binucleadas (CBN), las cuales están presentes en menor cantidad y se disponen a diferente profundidad y altura. Las primeras, son de forma columnar alta en las base de las vellosidades y se van modificando a cúbicas en el resto de las mismas, poseen un núcleo de gran tamaño con predominio de cromatina laxa y su citoplasma es de color claro. Las CBN son células de gran tamaño, de forma redondeada y contienen dos núcleos con cromatina laxa, su citoplasma se colorea con mayor intensidad que el de las CMN adyacentes. Estas células no se distribuyen uniformemente, algunas están ubicadas hacia la superficie del tejido y protruyen hacia el lado materno, mientras que hay otras que se ubican en la profundidad del epitelio fetal.

En los placentomas de 135 días de gestación se evidenció una estructura más compleja y desarrollada en relación a las placentas de 50 y 100 días. El tejido cotiledonario emite vellosidades primarias que rápidamente se ramifican en secundarias y terciarias penetrando las criptas carunculares con las que se entrelazan formando una malla interdigitada entre el tejido materno para aumentar la superficie de contacto con el tejido fetal. El epitelio cotiledonario en la base de las vellosidades es de tipo cúbico alto pseudoestratificado, compuesto principalmente por CMN con presencia de eritrocitos en su interior y escasas CBN. A medida que va avanzando hacia la parte materna este epitelio se ramifica y se transforma en un epitelio cúbico bajo que cuenta con una mayor cantidad de CBN a distinta altura o que están en la interfase materno-fetal. El tejido mesenquimático en el interior de las vellosidades presenta vasos sanguíneos de gran calibre. En las vellosidades secundarias y terciarias este tejido disminuye y se observan capilares pequeños (Figura 1C).

#### Inmunolocalización de Angiopoyetina-1.

La inmunomarcación para la proteína Ang-1 en el tejido placentario presentó un patrón citoplasmático. En las placentas de 50 y 100 días de gestación se observó una



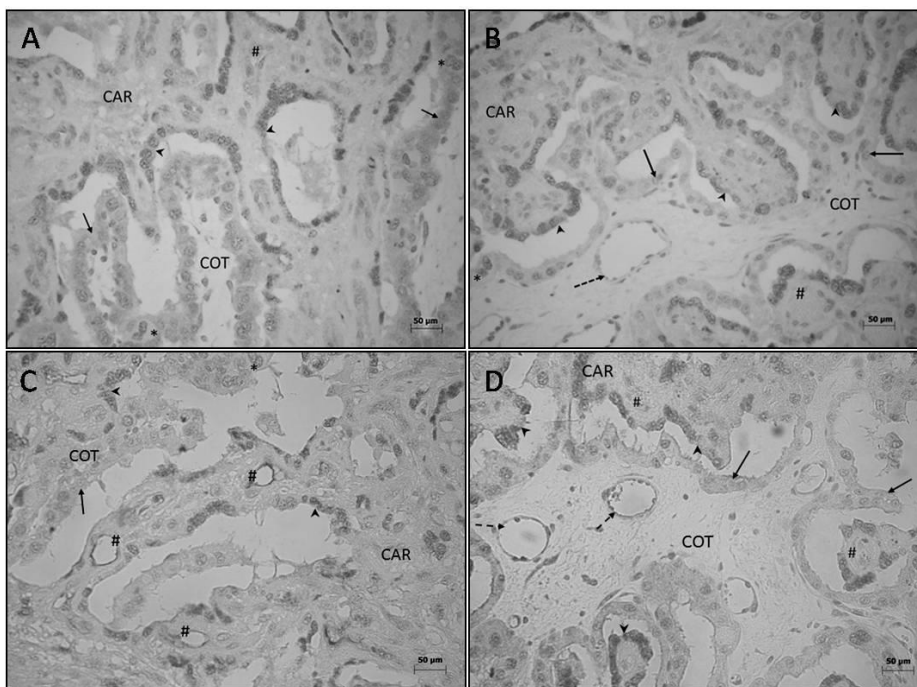
**Figura 1.** Microscopía óptica H/E de placentas caprinas. A: 50 días de gestación B: 100 días de gestación. C: 135 días de gestación. 400X. COT: cotiledón; CAR: carúncula; flecha continua: epitelio trofoblástico; cabeza de flecha: epitelio materno, flecha entrecortada: capilares fetales; #: capilares maternos, \* CBN: células binucleadas.

intensa inmunomarcación en el epitelio trofoblástico, en contraste con los sincitios del epitelio materno, cuya inmunomarcación fue débil. En las CBN también se observó una coloración débil en comparación con el resto del epitelio fetal. En los endotelios de los capilares maternos y fetales se evidenció una moderada inmunoreacción (Figura 2A). A los 135 días de gestación se observó que

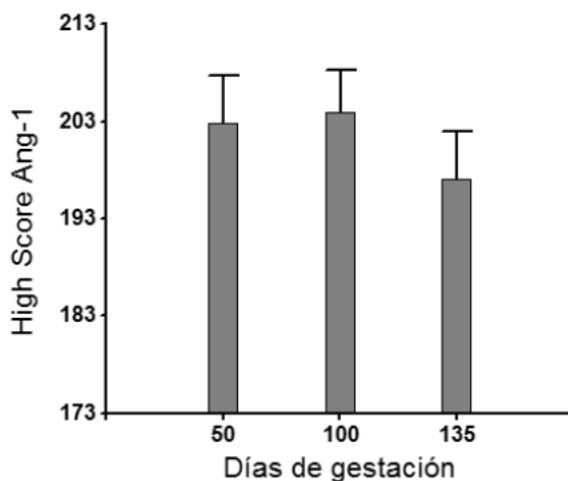
a medida que las vellosidades maduran y se ramifican en el tejido materno, la intensidad de inmunoreacción del epitelio trofoblástico se torna débil hasta desaparecer, mientras que en la base de las vellosidades la inmunomarcación fue intensa. En el tejido materno el citoplasma de los sincitios y de las CMN se inmunomarcaron en forma intensa. En contraste, las células

endoteliales fetales y maternas no presentaron inmunoreacción (negativa) (Figura 2B).

El análisis de HSCORE para Ang-1 demostró que no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) en la intensidad de inmunomarcación entre los diferentes periodos de gestación analizados en placentas caprinas (Figura 3).



**Figura 2.** Inmunolocalización de Ang-1: A (100 días) y B (135 días) y su receptor Tie-2: C (100 días) y D (135 días) en placentas caprinas. COT: cotiledón; CAR: carúncula; flecha continua: epitelio trofoblástico; cabeza de flecha: epitelio materno; flecha entrecortada: capilares fetales; #: capilares maternos, \* CBN.



**Figura 3.** High Score de la inmunohistoquímica de Ang-1 en placentas de cabras gestantes. Las columnas representan la media  $\pm$  EE,  $p < 0,05$ .



### **Inmunolocalización del receptor Tie-2**

Al igual que Ang-1, la inmunomarcación del receptor Tie-2 presentó una localización citoplasmática. Tanto en las células endoteliales de los capilares fetales y maternos como en las células del epitelio trofoblástico, se observó una moderada inmunoreacción. Este patrón se evidenció en todos los períodos analizados. Por otro lado, el epitelio endometrial, a los 135 días de gestación, presentó una inmunoreacción débil (Figura 2C y D).

## **DISCUSIÓN**

La placenta posee una organización estructural que le posibilita lograr un eficiente intercambio entre los tejidos de la madre y el feto para optimizar el crecimiento y el desarrollo fetal<sup>17</sup>. Por medio del estudio de la estructura placentaria caprina durante la gestación se pudo evidenciar que es coincidente con lo descrito por otros autores para esta especie<sup>2, 13, 29</sup>.

Para que la placenta pueda desempeñar su función en el intercambio materno-fetal, se necesita de una red vascular apropiada originada de los procesos de vasculogénesis y angiogénesis, la que es regulada por factores angiogénicos<sup>20</sup>. En este estudio no se evidenciaron diferencias en la intensidad de la inmunomarcación en los tejidos placentarios a lo largo de la gestación mediante High Score. Sin embargo, algunos autores demostraron en la placenta humana que, a lo largo de la gestación, la expresión de la Ang-1 se incrementó, mientras que Ang- 2 y Tie-2 disminuyeron<sup>10, 30</sup>.

En nuestro trabajo, se observó en las distintas edades gestacionales variaciones en la inmunolocalización de Ang-1 en los tejidos que conforman la placenta. Esto indicaría su importancia funcional en la supervivencia, maduración y estabilidad del endotelio vascular. En otras investigaciones realizadas por Seval *et al.*, (2008) y Goldman-Wohl *et al.* (2000), demostraron la localización de Ang-1 en placentas humanas durante el primer tercio de la gestación con una marcación intensa en el citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto.

A partir del estudio cualitativo, la inmunolocalización de Ang-1 se observó

principalmente en el epitelio trofoblástico en los días 50 y 100 de la gestación, y en el epitelio materno a los 135 días. En relación a las células endoteliales, Seval *et al.* (2008), evidenciaron una débil coloración; mientras que nosotros observamos una moderada marcación tanto en el endotelio fetal como en el materno.

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

Estudios en placentas ovinas<sup>20</sup> permitieron identificar la importancia de Ang-1 y 2 y su receptor Tie-2, que al actuar en forma conjunta con el VEGF y el FGF promueven la remodelación, la organización microvascular y la sobrevivencia de las células endoteliales.

## **CONCLUSIÓN**

La participación de los factores angiogénicos en la placenta de los caprinos indica la relación entre el VEGF y las angiopoyetinas. Ang-1/ Tie-2 controlan la diferenciación vascular

fetoplacentaria y en forma conjunta con el VEGF, actuarían de forma autocrina y paracrina en el proceso de angiogénesis para garantizar el desarrollo y maduración de la vasculatura placentaria y su remodelación durante los distintos períodos de la gestación.

Esta investigación pretende contribuir en el avance de los conocimientos vinculados a la angiogénesis placentaria. Consideramos que, además, es necesario investigar el rol de Ang-2 para interpretar el funcionamiento del sistema de Angiopoietina-Tie-2 y de factores antiangiogénicos que se encuentran involucrados en la angiogénesis placentaria caprina en condiciones fisiológicas. De este modo, la identificación de los factores que intervienen en la angiogénesis placentaria puede ser de utilidad para comprender los mecanismos involucrados en situaciones de estrés nutricional, que frecuentemente se presentan en la producción caprina de Argentina.

## BIBLIOGRAFÍA

- Augustin, H.G.; Koh, G.Y.; Thurston, G.; Alitalo, K. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2009; 10:165-177.
- Barbeito, C.; Galosi, C.; Monteavaro, C.; et al. Patología placentaria, conocimientos generados por estudios experimentales. 2010. ANAV, 64, 87-116.
- Bazer, F.; Spencer, T.; Johnson, G.; Burghardt, R.; Wu, G. Comparative aspects of implantation. *Reproduction.* 2009; 138:195-209.
- Cristofolini, A.; Merkis, A.; Barroso, F.; et al. Determinación de apoptosis por TUNEL e inmunoreactividad de las proteínas BCL-2 y BAX durante la placentación porcina. *Revista argentina de producción animal.* 2013; 30(1): 43-49.
- Davis, S.; Aldrich, T.; Jones, P; et al. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell.* 1996; 87: 1161-1169.
- Díaz, T.; Merkis, C.I.; Cots, D.S.; et al. Angiogenesis at Different Stage of Pregnancy in Goat Placenta. *J. Life Sci.* 2015; 9:391-398.
- Di Rienzo, J.; Casanoves, F.; Balzarini, M.; Gonzales, L.; Tablada, M.; Robledo, C. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. 2009.
- Dunk, C.; Shams, M.; Nijjar, S.; et al. Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 activate trophoblast Tie-2 to promote growth and migration during placental development. *Am. J. Pathol.* 2000; 156: 2185-2199.
- Fukuhara, S.; Sako, K.; Noda, K.; Zhang, J.; Minami, M.; Mochizuki, N. Angiopoietin-1/Tie2 receptor signaling in vascular quiescence and angiogenesis. *Histol. Histopathol.* 2010; 25:387-396.
- Geva, E.; Ginzinger, D.; Zaloudek, C.; Moore, D.; Byrne, A.; Jaffe, R. Human placental vascular development: Vasculogenic and angiogenic (branching and nonbranching) transformation is regulated by vascular endothelial growth factor-A, angiopoietin-1, and angiopoietin-2. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; 87:4213-4224.
- Goldman-Wohl, D.; Ariel, I.; Greenfield, C.; Lavy, Y.; Yaguel, S. Tie-2 and angiopoietin-2 expression at the fetal-maternal interface: a receptor ligand model for vascular remodeling. *Mol. Hum. Reprod.* 2000; 6(1):81-87.
- Grazul-Bilska A.; Borowicz, P.; Johnson, M.; et al. Placental development during early pregnancy in sheep: vascular growth and expression of angiogenic factors in maternal placenta. *Reproduction.* 2010; 140:165-174.
- Igwebuike, U.; Ezeasor, D. Morphological assessment of placental trophoblastic epithelium in the placenta of West African Dwarf goats: A light and electron microscopic study. *Anim. Reprod. Sci.* 2012; 136: 61- 68.
- Kappou, D.; Sifakis, S.; Konstantinidou, A.; Papantoniou, N.; Spandidos, D. Role of the angiopoietin/Tie system in pregnancy. *Exp. Ther. Med.* 2015; 9(4):1091-1096.
- Kayisli, U.; Cayli, S.; Seval, Y.; Tertemiz, F.; Huppertz, B.; Demir, R. Spatial and temporal distribution of Tie-1 and Tie-2 during very early development of the human placenta. *Placenta.* 2006; 27(6): 648-659.
- Krikun, G.; Schatz, F.; Finlay, T.; et al. Expression of Angiopoietin-2 by Human Endometrial Endothelial Cells: Regulation by Hypoxia and Inflammation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; 275:159-163.
- Penninga, L.; Longo, L. Ovine placental morphology: effect of high altitude, long-term hypoxia. *Placenta.* 1998; 19 (2-3):187-193.
- Redmer, D.; Aitken, R.; Milne, J.; Reynolds, L.; Wallace, J. Influence of maternal nutrition on messenger RNA expression of placental angiogenic factors and their receptors at mid gestation in adolescent sheep. *Biol. Reprod.* 2005; 72: 1004-1009.

19. Reynolds, L.; Redmer, D. Utero-placental development and placental function. *J. Anim. Sci.* 1995; 73:1839-1851.
20. Reynolds, L.; Borowicz, P; Vonnahme, K.; et al. Animal Models of Placental Angiogenesis. *Placenta.* 2005; 26: 689-708.
21. Reynolds, L.; Caton, J.; Redmer, D.; et al. Topical Review: Evidence for altered placental blood flow and vascularity in compromised pregnancies. *J Physio.* 2006. 572:51-58.
22. Roa, I.; Smok, S.; Prieto, G. Placenta; anatomía e histología comparada. *Int. J. Morphol.* 2012; 30(4):1490-1496
23. Sato, T.; Qin, Y.; Kozak, C.; Audus, K. Tie-1 and tie-2 define another class of putative receptor tyrosine kinase genes expressed in early embryonic vascular system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993; 90:9355-9358
24. Santos, R.; Barreto Filho, J.; Marques, A.; Andrade, J. Volumetric proportions of the goat placenta structural components throughout gestation. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 1998; 35 (4): 156-160.
25. Seval, Y.; Sati, L.; Celik-Ozenci, C.; Taskin, O.; Demir R. The distribution of angiopoietin-1, angiopoietin-2 and their receptors tie-1 and tie-2 in the very early human placenta. *Placenta.* 2008; 29: 809-815.
26. Soares, M.; Chapman, B.; Rasmussen, C.; Dai, G.; Kamei, T. Differentiation of trophoblast endocrine cells. *Placenta.* 1996; 17: 277-289.
27. Shimizue, T.; Hoshino, Y.; Miyazaki, H.; Sato, E. Angiogenesis and microvasculature in the female reproductive organs: physiological and pathological implications. *Curr. Pharm Des.* 2012; 18:303-309.
28. Wallace, J.; Regnault, T.; Limesand, S.; Jr. Hay, W.; Anthony, R. Investigating the causes of low birth weight in contrasting ovine paradigms. *J Physiol.* 2005; 565: 19-26.
29. Wooding, P; Burton, G. Comparative placentation: structure, functions and evolution. *Springer. Verlag Berlin Heidelberg.* 2008; 1-291.
30. Zhang, E.; Smith, S.; Baker, P; Charnock-Jones, D. The regulation and localization of angiopoietin-1, -2, and their receptor Tie2 in normal and pathologic human placentae. *Mol. Med.* 2001; 7: 624-635