

# Vasculogénesis y angiogénesis durante el embarazo normal y en la preeclampsia

Drs. Eduardo Reyna-Villasmil\*, Carlos Briceño-Pérez\*\*, Duly Torres-Cepeda\*

## INTRODUCCIÓN

La investigación de los mecanismos que regulan el desarrollo de nuevos vasos es crucial para la comprensión de la biología tumoral y el desarrollo del embarazo temprano. Existen sorprendentes similitudes entre, por un lado, la invasión y vascularización tumoral y, por otra parte, la implantación del blastocito y el desarrollo placentario (1). Estos dos eventos comparten hallazgos importantes:

- \* Proliferación, migración e invasión de la matriz extracelular.
  - \* Capacidad de acceder a la vasculatura del huésped y captar nutrientes de este.
- A pesar de estos hallazgos comunes, existen al menos dos diferencias importantes:
- \* La invasión y formación de nuevos vasos durante el embarazo es auto-limitada, comparado con el crecimiento descontrolado del tumor y la formación de vasos durante la oncogénesis.
  - \* La implantación del embrión no solo le concede acceso a la vasculatura materna, sino que también forma su propio sistema vascular; mientras que el tumor no tiene esta capacidad de generar vasos.

Generalmente se acepta que los vasos sanguíneos se forman por dos procesos consecutivos: vasculogénesis y angiogénesis. Durante la vasculogénesis, se logra la formación de vasos primitivos tempranos por diferenciación *in situ* de células madres hemangiopoyéticas que se derivan de las células mesenquimales pluripotenciales. Las células madres

hemangiogénicas posteriormente se diferencian en células madres hemangioblásticas que dan origen a las células angioblásticas, progenitoras de las células endoteliales y a las células hemangioblásticas, progenitoras de las células hematopoyéticas (2). Durante la angiogénesis, los nuevos vasos sanguíneos se derivan de los ya existentes (3).

Los términos angiogénesis y vasculogénesis han sido empleados como sinónimos para caracterizar la formación y desarrollo general de los vasos sanguíneos. Sin embargo, aún no existe acuerdo sobre el significado exacto de los dos términos. Aunque han sido claramente definidos (4), sus significados característicos no son apropiada y uniformemente utilizados. La angiogénesis ha sido utilizada para describir la migración de los angioblastos, desarrollo de células endoteliales de los vasos sanguíneos preexistentes y brotes de las células endoteliales (5,6). Muchas revisiones han resumido la descripción de los términos, mecanismos y tipos celulares relacionados con el desarrollo de los vasos sanguíneos (7).

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 a incremento de la permeabilidad vascular. El principal objetivo del proceso es asegurar el flujo sanguíneo. Diferentes factores afectan la angiogénesis y la vasculogénesis en una forma autocrina o paracrina, al igual que directa o indirectamente, estimulando la proliferación y diferenciación de las células precursoras endoteliales (3,8).

## Factores de crecimiento endotelial vascular y sus receptores

Los factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF por sus siglas en inglés) son los principales

\* Servicio de Obstetricia y Ginecología. Hospital Central "Dr. Urquinaona". Maracaibo. Estado Zulia.

\*\* Departamento de Obstetricia y Ginecología. Unidad Docente Hospital Chiquinquirá. Universidad del Zulia. Maracaibo. Estado Zulia.

factores de crecimiento involucrados en la vasculogénesis y angiogénesis (2). Tienen papel importante como mitógenos de las células endoteliales (9) y se expresan en diferentes tejidos, incluyendo la placenta (10,11). Otros factores bien estudiados involucrados en los procesos son los factores de crecimiento de fibroblastos ácido y básico (FGF-1, FGF-2) (12) y el factor de crecimiento placentario (PIGF) (13).

Cuando se describió inicialmente, se pensó que el VEGF actuaba como un factor de permeabilidad vascular (14). Hasta ahora, han sido descritos cuatro diferentes subtipos de VEGF (15). El primero en ser identificado, VEGF-A, es una glicoproteína homodimérica unida a un bisulfito que juega un papel importante en la vasculogénesis, angiogénesis, permeabilidad vascular y vasodilatación (16-18). El VEGF es un factor de crecimiento unido a la heparina que actúa a través de los receptores de superficie. Los receptores para el VEGF, VEGFR-1 y VEGFR-2, son receptores tipo III de cinasa de tirosina (19). Diferentes estudios han demostrado claramente que ambos receptores están involucrados en la formación de capilares y el desarrollo vascular durante la embriogénesis (20,21). El VEGF y sus receptores se expresan en el endotelio de los vasos sanguíneos y contribuyen al desarrollo y regulación de la permeabilidad vascular (22,23).

Recientemente se ha investigado la expresión de VEGF, sus receptores y los receptores de angiopoyetina (Tie-1 y Tie-2) en relación con la maduración vascular en la placentación humana temprana (24,25). La importancia de los receptores de angiopoyetina ha sido previamente descrita con relación a la formación y maduración de los vasos sanguíneos en diferentes tejidos (23,26,27). En los últimos años, las vasculogénesis y angiogénesis placentaria han sido estudiadas en sus diferentes aspectos, como el perfil de cambios moleculares de los complejos endoteliales durante el embarazo normal, los cambios en las complicaciones del embarazo y su regulación molecular (28-30).

De acuerdo con esos estudios, el VEGF-A, pequeñas cantidades de VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y otros miembros de la familia VEGF han sido detectados en la placenta (31). Los receptores de VEGF (VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3) se han identificado en los tejidos placentarios (32). El VEGFR-1 es el receptor para PIGF, VEGF-A y VEGF-B (33); mientras que el VEGFR-2 es el receptor para VEGF-A, VEGF-C y VEGF-D (22). El VEGFR-3 es el receptor para VEGF-C y VEGF-D, el

cual parece jugar un papel importante en la regulación de la angiogénesis y linfangiogénesis (34).

En los ratones donde se inhibe la VEGF (8) y en ausencia de VEGFR-2 (35), no se observa diferenciación de las células precursoras de células endoteliales que ocurre durante la vasculogénesis. Por otra parte, una mutación en el locus del VEGFR-1 (36), no previene la generación de células endoteliales pero produce desorganización endotelial y formación de vasos anormales durante el desarrollo embrionario temprano. En experimentos con ratones se ha hecho evidente la importancia del VEGFR-2 para la selección y diferenciación temprana de las células hemangiogénicas dentro de los capilares placentarios y del VEGFR-1 para el posterior arreglo temprano de las células endoteliales para formar tubos endoteliales (35,37).

### Integrinas

Las integrinas son una familia de proteínas que se unen a sus ligandos con baja afinidad y están presentes en concentraciones más altas que los receptores de hormonas u otras moléculas solubles de señalización. Sus propiedades permiten a la célula explorar su ambiente sin unirse irreversiblemente a este (38). Son importantes debido a que sus moléculas principales permiten a las células unirse y responder a la matriz extracelular. Están formadas por dos subunidades de glicoproteínas de membranas asociadas en forma no covalente llamada  $\alpha$  y  $\beta$ . La porción intracelular del dímero se une al citoesqueleto de actina (mediante proteínas como la talina y la actina  $\alpha$ ) (39). Se ha demostrado que la importancia funcional de las integrinas que migran con el trofoblasto es la de mantener la adhesión de las células trofoblásticas a la matriz extracelular (40).

Las siguientes integrinas han sido detectadas en el trofoblasto extraveloso (39):

- \*  $\alpha3/\beta1$ , la cual es un receptor para la laminina.
- \*  $\alpha6/\beta4$ , la cual se une a la laminina a través del colágeno IV.
- \*  $\alpha5/\beta1$ , un receptor de fibronectina.
- \*  $\alpha1/\beta1$ , un receptor para laminina y colágenos I y IV.
- \*  $\alpha v/\beta3$  y  $\alpha v/\beta5$ , los cuales son receptores para vitronectina, fibronectina y osteopontina.

El trofoblasto extraveloso en el embarazo normal sufre un cambio gradual del fenotipo proliferativo al invasivo. Estos cambios fenotípicos también están asociados a modificaciones en la expresión de las integrinas. El trofoblasto veloso con fenotipo

proliferativo, localizado cerca de la lámina basal de la vellosidad de anclaje, expresa predominantemente  $\alpha 6/\beta 4$  y, en parte,  $\alpha 3/\beta 1$  (41). La integrina  $\alpha 6/\beta 4$  es un receptor de laminina cuya función es anclar las células epiteliales a la membrana basal. Esta función puede ser realizada por la larga porción intracitoplasmática de la subunidad  $\beta 4$  (42). Las células que expresan este tipo de integrinas también expresan marcadores proliferativos y no tienen actividad invasora. En contraste, el trofoblasto invasor en la decidua expresa integrinas intersticiales (como la  $\alpha 5/\beta 1$ ,  $\alpha 1/\beta 1$ ,  $\alpha v/\beta 3$  y  $\alpha v/\beta 5$ ), las cuales se unen a la fibronectina y regulan ciertas metaloproteinasas (por ejemplo la metaloproteinasa 2 y 11) (41).

#### **Factor de crecimiento de los fibroblastos**

Representa una gran familia de factores de crecimiento y diferenciación con por lo menos 18 miembros. Los dos más importantes son el FGF-1 (FGF ácido) y FGF-2 (FGF básico), que comparten más del 50 % de similitud estructural. Ambos factores estimulan la proliferación y modulan la función de las células endoteliales, inhiben la apoptosis y son quimiotácticos. Tienen alta y baja afinidad por los receptores de FGF. La familia de receptores de alta afinidad es representada por los receptores de FGF 1-4, los cuales son receptores de cinasa de tirosina y son responsables de las funciones de señalización. Los receptores de baja afinidad están involucrados en la estabilización del ligando y la mayoría de ellos son proteoglicanos de heparan sulfato. También se presentan en una forma soluble en los líquidos biológicos y la matriz extracelular (43,44).

#### **Angiopoyetinas**

Las angiopoyetinas (Ang-1 y Ang-2) están involucradas en la formación de la vasculatura durante la vasculogénesis. Ambas son ligandos del receptor Tie-2 (un receptor de cinasa de tirosina, que se expresa en las células endoteliales y hematopoyéticas). Un receptor previamente descrito en esta clase (Tie-1) permanece como un receptor huérfano debido a que no se ha encontrado su ligando. Las angiopoyetinas están involucradas en la estabilización y remodelación del plexo capilar primario y son responsables de la supervivencia de las células endoteliales (45,46). La Ang-1 se expresa en el cito y sinciotrofoblasto, mientras que la Ang-2 y Tie-2 se expresan predominantemente en el citotrofoblasto (47).

#### **Inhibidores de la angiogénesis**

Los dos más potentes inhibidores naturales de la

angiogénesis son la angiostatina y la trombospodina. La angiostatina es un fragmento proteolítico que tiene una fuerte acción antiproliferativa sobre las células endoteliales y también suprime el crecimiento de los tumores primarios en ratones (48). La trombospodina es derivada de la tromboplastina de las plaquetas activadas y se conoce que es producida por muchos tipos celulares, incluyendo células endoteliales, macrófagos, neutrófilos y fibroblastos. La angiostatina modula la adhesión y tiene efectos quimiotácticos tanto *in vitro* como *in vivo*, mientras que la trombospodina unida podría promover las respuestas angiogénicas (49).

#### **Aspectos generales de la vasculogénesis y angiogénesis**

Las células endoteliales constituyen la unidad funcional central de las estructuras vasculares y se especializa 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. Estos procesos son necesarios para la organogénesis y el desarrollo embrionario exitoso y han sido ampliamente estudiadas en modelos animales. En especie animales que dependen de la función placentaria para el desarrollo embrionario, la creación, maduración y mantenimiento de la red vascular placentaria, es también de importancia vital. 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, 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 (50).

#### **Vasculogénesis**

Es un proceso por el cual se forman nuevos vasos por diferenciación y migración de las células progenitoras endoteliales para formar capilares interconectados. Células endoteliales y hematopoyéticas comparten un progenitor común, la célula hemangioblástica. Estas células forman agregados en el desarrollo del saco embrionario (llamadas islas sanguíneas) y la desaparición de los factores de transcripción dentro

de estas células lleva a fallas en la hematopoyesis y en el desarrollo de las células endoteliales (51,52). Además, estas células son positivas al VEGFR-2. Los estudios de delección genética han demostrado que los embriones que carecen de este gen mueren al noveno día posterior a la concepción (35,53).

Las señales que regulan la migración y organización de estas células en túbulo son complejas y solo algunos de los factores involucrados han sido identificados. Sin embargo, la ablación del VEGFR, incluye la separación alternativa que lleva a la liberación del receptor soluble de VEGF (sVEGFR-1), el cual es un antagonista del VEGF que es letal para el embrión (36). Estos efectos parecen ser debidos a la selección de las células hemangioblásticas, llevando a desorganización (y ausencia de función) de los capilares (37). Se conoce que otros genes afectan este proceso, por ejemplo el factor 1 de crecimiento y transformación; aunque este mecanismo no está claro (54).

El proceso descrito anteriormente lleva al desarrollo del saco embrionario. Posteriormente la hematopoyesis ocurre en el hígado fetal. Hasta hace poco, se ha presumido que la vasculogénesis estaba restringida al desarrollo embrionario, pero datos más recientes indican que, en los adultos, los precursores endoteliales en la médula ósea pueden ser incorporados en los vasos en crecimiento en sitios distantes. Este proceso parece realizarse tanto en situaciones fisiológicas como patológicas (55,56). No existen datos que indiquen si procesos similares de vasculogénesis ocurren en el embrión en desarrollo donde los precursores primitivos pueden ser transportados, por ejemplo, del hígado a capilares en crecimiento o remodelación de los mismos (por ejemplo la placenta). Debido a que la sangre del cordón umbilical es una estructura rica en células madres esto parecería probable.

### Angiogénesis

Es la generación de nuevos vasos a partir de vasos sanguíneos preexistentes, lo cual se puede lograr por una variedad de procesos diferentes incluyendo: brotes, intusección y elongación por proliferación endotelial o intercalado de células progenitoras endoteliales. Debido a que la angiogénesis es un grupo complejo de procesos dinámicos tridimensionales que varían en espacio y tiempo, es posible inferir una cantidad limitada de detalles mecanicistas al observar solo los puntos finales de estos procesos (57). Aunque los resultados finales (incremento en el número y / o longitud de los segmentos capilares)

pueden ser similares, el examen cuidadoso de la red capilar usando métodos morfológicos puede requerir un análisis refinado de los procesos involucrados. Algunas formas de angiogénesis (por ejemplo, los brotes angiogénicos), por definición, llevarían a la formación de ramas adicionales, mientras la angiogénesis no ocurrirá debido a los cambios en la forma, tamaño y número de las células (pero los segmentos o longitud inter-ramas se incrementarán).

Los pasos requeridos para el brote angiogénico se han aclarado considerablemente en años recientes y muchos de los factores involucrados en estas etapas (por ejemplo los puntos del control de los procesos) han sido descubiertos (50,58,59). Los principales pasos que han sido identificados son los siguientes:

1. Vasodilatación e incremento de la permeabilidad vascular.
2. Activación de las proteasas que llevan a degradación de la membrana basal.
3. Incremento y proliferación de las células endoteliales.
4. Migración de las células endoteliales (probablemente debido a estímulos quimiotácticos).
5. Ensamblaje de las células endoteliales para formar un túbulo con lumen permeable.
6. Selección de pericitos fuera de los capilares para formar vasos estables.

Esto obviamente es un proceso de múltiples pasos y, por tanto, involucra numerosos factores que pueden regular el proceso en diferentes formas. Por ejemplo, la producción de proteasas activadas puede ser regulada en diferentes niveles los cuales incluyen transcripción, traslado, procesamiento proteolítico (activación), unión a receptores (en el caso del activador plasminógeno urocina); y por la producción de inhibidores de las proteasas como los inhibidores del activador de plasminógeno y los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas de la matriz. En forma similar, la migración y las características organizacionales de las células endoteliales pueden regular o influir en los componentes de la matriz celular y las integrinas y caderinas (59).

Diferentes estudios han demostrado la sobreexpresión de VEGF-A, Ang-1 y PIGF que lleva a incremento en el número de vasos y, en el caso del VEGF-A y el PIGF, un incremento de la permeabilidad vascular (60,61). La sobreexpresión de VEGF-C o VEGF-D lleva a incremento de las estructuras linfáticas (62).

Estos estudios revelan la importancia de estos factores en la angiogénesis y ponen de manifiesto

la complejidad del proceso debido a que los vasos que se producen por la sobreexpresión de un factor único generalmente son anormales. En el caso de la vasculatura fetoplacentaria, numerosos factores angiogénicos y anti-angiogénicos conocidos están presentes pero la forma en la que ellos interactúan y las consecuencias moleculares de tales interacciones aún no son comprendidos en su totalidad.

### **Diferenciación de células madres mesenquimales en células progenitoras endoteliales**

Durante el embarazo temprano, el tejido mesenquimal se localiza en forma medular dentro del centro veloso y el trofoblasto veloso que lo rodea para construir la lámina epitelial bilaminar. Dependiendo del estado de maduración de la vellosidad, los vasos sanguíneos pueden desarrollarse en forma central o periférica en la vecindad directa de la capa citotrofoblástica (24). En regiones específicas del centro de la vellosidad, las células madres hemangiogénicas son inducidas y seleccionadas para convertirse en un tipo particular de célula. Además de notables cambios morfológicos, estudios moleculares han revelado que en las células precursoras de la vasculogénesis se expresan proteínas distintas justo antes del inicio del desarrollo vascular, denominado pre-modelo vasculogénico (63). Los tipos celulares particulares emergen dentro de las vellosidades mesenquimales directamente siguiendo la invasión del tejido mesenquimatoso dentro de la vellosidad trofoblástica primaria (Cuadro 1). Las células madres hemangioblásticas son sometidas a morfogénesis, comienzan la migración e inician el proceso durante el cual células angiogénicas se desarrollan y cambian su organización (28).

Durante la vasculogénesis y angiogénesis placentaria, células mesenquimales pluripotenciales específicas se diferencian en células madres hemangiogénicas. Las células pluripotenciales pueden renovarse y producir distintos tipos de células hijas (64,65). Distintos tipos de células angioblásticas y hematopoyéticas deriva de las células madres hemangiogénicas. Las células madres son reguladas por un programa de genes altamente especializados que involucran proliferación y diferenciación celular (66).

La principal célula madre de la vasculogénesis placentaria es la célula mesenquimal pluripotencial. Estas se ubican alrededor de la lámina citotrofoblástica y forman el paquete de células hemangiogénicas llamadas modelo vascular primitivo. Esas células madres hemangiogénicas mantienen

una relación cercana con la lámina trofoblástica mediante proyecciones citoplasmáticas. Tanto las células trofoblásticas como las células madres hemangiogénicas tienen una fuerte positividad para el VEGF y sus receptores.

El primer signo del modelo vascular primitivo formado por las células hemangiogénicas se observa en el estroma de las vellosidades mesenquimales y en las vellosidades intermedias inmaduras, inmediatamente por debajo de la lámina trofoblástica y paralelo al eje veloso ubicado debajo de la capa de células citotrofoblástica. Este modelo vascular primitivo se transforma en formas diferentes bajo condiciones específicas para formar nuevas estructuras vasculares (67). Por ejemplo, pueden tener la apariencia similar a células angiogénicas con o sin lumen, células angiogénicas con o sin polos alargados o células angiogénicas con o sin túbulos de interconexión. Los estudios ultraestructurales revelan que estos patrones están relacionados con la membrana basal de las células del citotrofoblasto (24).

La formación vascular *de novo* (vasculogénesis) es inducida y regulada por varios factores. Se ha demostrado que en las vellosidades mesenquimales, en estados muy tempranos de la placentación, la lámina citotrofoblástica es fuertemente inmunopositiva al VEGF y sus receptores (24). Con relación a la maduración segmentaria de las vellosidades, el marcado inmune del VEGF y sus receptores disminuye en la capa citotrofoblástica y aumentan las células de Hofbauer y algunas células similares al fibroblasto en las vellosidades intermedias inmaduras.

En la siguiente etapa de maduración de las vellosidades, mientras la vasculogénesis continúa, la angiogénesis comienza. Por tanto, las células de Hofbauer que son inmunopositivas a los factores angiogénicos son seleccionadas para ejercer una función de activación en las vellosidades intermedias inmaduras. Estas observaciones se han realizado en paralelo para establecer la función de activación de la maduración de las vellosidades, junto a la vasculogénesis y angiogénesis (67). Por lo tanto, dependiendo del tipo de vellosidad, el VEGF se produce abundantemente en las células del citotrofoblasto veloso, y a su vez, en las células de Hofbauer y fibroblastos.

Durante el proceso de diferenciación de las células mesenquimales pluripotenciales para iniciar la diferenciación de las células madres hemangiogénicas, la expresión de algunos marcadores, como CD31 y CD34, se observan en las profusiones citoplasmáticas periféricas de estas células. Para la formación de los

Cuadro 1  
Representación esquemática de la vasculogénesis y angiogénesis placentaria

	Mecanismo de producción	Potencial celular	Tipo celular	Origen
		Célula totipotencial con autorrenovación	Células madres embriónicas	Mesodermo embrionario
Paso 1 Citotrofoblasto vellosos (acción del VEGF, PlGF, VEGFR-1, VEGFR-2, Tie-1, Tie-2, angiopoyetina 2)	Inducción paracrina de diferenciación, proliferación y migración	Célula pluripotencial con autorrenovación	Células mesenquimales extraembriónicas (células precursoras hemangiogénicas)	Mesodermo extraembriónico
		Células con amplio potencial de autorrenovación	Células madres multipotenciales (Células progenitoras hemangiogénicas)	Vellosidades coriónicas
		Células con potencial limitado de autorrenovación	Células progenitoras hemangioblásticas	Vellosidades coriónicas
		División limitada	Células progenitoras hematopoyéticas	Vellosidades coriónicas
Paso 2 Citotrofoblasto vellosos, macrófagos y fibroblastos fetales (Acción del VEGF, PlGF, FGF, VEGFR-1, VEGFR-2, Tie-1, Tie-2, angiopoyetina 2, FGFR)	Activación	División limitada	Células progenitoras hemangioblásticas	Vellosidades coriónicas
		División limitada	Acúmulo de células angioblásticas	Vellosidades coriónicas
		División limitada	Endotelio inicial con lumen primitivo	Vellosidades coriónicas
Paso 3 Componentes de la matrix extracelular, células perivasculares (acción de VEGF, PlGF, óxido nítrico, VE-caderina, VEGFR-1, VEGFR-2, Tie-1, Tie-2, Angiopoyetina 2, Sintetasa de óxido nítrico)	Remodelación	División de células a células perivasculares	Células perivasculares	Vellosidades coriónicas

túbulos capilares primitivos, los acúmulos de células hemangiogénicas se ubican cerca de la membrana basal de la lámina citotrofoblástica de las vellosidades mesenquimales y establece contacto por sus procesos citoplasmáticos (24).

Las series de células hematopoyéticas se derivan de las células madres hemangioblásticas con núcleos coloreados en forma muy densa, que son rodeadas por células progenitoras endoteliales. Las células hemangiogénicas son positivas tanto a CD31 como CD34. La posterior diferenciación de las células hematopoyéticas no muestra ninguna inmunorreactividad a estas proteínas (67).

Las células mesenquimales placentarias extraembrionarias son probablemente derivadas de las células madres embrionarias totipotenciales, mientras que las potentes células madres hemangiogénicas se derivan de las poblaciones celulares mesenquimales pluripotenciales. Este proceso de desarrollo y diferenciación continúa con las células hemangioblásticas, angioblásticas y angiogénicas del cordón umbilical, seguido por la transformación a series de células angioblásticas, presumiblemente a poblaciones de células endoteliales y perivasculares (67). Se debe recordar que en el proceso de diferenciación, el grado de auto-renovación disminuye con el estadio de diferenciación de las células, y todo el proceso ocurre dentro del centro mesenquimal de la vellosidad coriónica.

### **Pasos secuenciales durante la vasculogénesis y angiogénesis placentaria**

Todos los tejidos placentarios contienen una mezcla de vellosidades en diferentes estadios de desarrollo. Se puede encontrar diferentes composiciones estructurales dentro de la misma sección de la vellosidad, reflejando diferentes segmentos estructurales de desarrollo vascular y de maduración. Sin embargo, este tipo de presentación de las vellosidades puede ayudar a comparar los estados angiogénicos dentro de una única vellosidad. Las muestras placentarias de estadios tempranos del embarazo en humanos pueden ser utilizadas para identificar tipos específicos de vellosidades y células para analizar los estadios angiogénicos dentro de dichas muestras.

Se ha producido una mejor comprensión de la importancia de los pasos secuenciales durante la angiogénesis y la vasculogénesis temprana en la placentación (24,68). Durante la fase inicial de la placentación, el árbol de vellosidades coriónicas primarias de la placenta humana está formada por

tres componentes: las dos láminas trofoblásticas y el mesodermo extraembrionario central. La vascularización fetal en la placenta humana es el resultado de la formación *de novo* local de capilares a partir de las células precursoras mesenquimales (vasculogénesis) en la vellosidad placentaria, más que por profusión de vasos embrionarios en la placenta (67). Los procesos de la vasculogénesis y angiogénesis están principalmente restringidos al período de formación del árbol veloso del desarrollo placentario. Existen reacciones seriadas entre el centro de la vellosidad y las capas trofoblásticas que lleva a pensar que cada una puede afectar la función de la otra por un mecanismo paracrino (69). Diferentes estudios han demostrado que los primeros signos de la vasculogénesis en el árbol veloso coriónico son evidentes a los 21 días después de la concepción, durante el estadio de embrión de cuatro somitas (28). En esta fase, en la vellosidad coriónica, las células madres hemangiogénicas derivan de las células mesenquimales diferenciadas antes de la formación del primer vaso, más que originarse de los monocitos en sangre (70). Más aún, la aparición temprana de macrófagos (células de Hofbauer) en la vellosidad coriónica, regulando distintas funciones del trofoblasto y la expresión del VEGF, sugirieron un papel paracrino de estas células durante los primeros estadios de la vasculogénesis (24,69,71).

Existen tres pasos de vasculogénesis y angiogénesis placentaria durante la maduración de las vellosidades (67):

**Paso 1:** Vasculogénesis: comienza con las células madres hemangiogénicas inducidas para diferenciarse en una forma paracrino por las células del citotrofoblasto por el VEGF.

**Paso 2:** Angiogénesis I: Redes neovasculares que aparecen paso a paso durante la angiogénesis, inducida por los factores de crecimiento derivados de las células citotrofoblásticas y de Hofbauer.

**Paso 3:** Angiogénesis II: 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 citokinas derivados del ambiente local de las vellosidades al igual que la circulación fetal ya establecida.

Las principales células madres son las hemangiogénicas. Estas muestran diferenciación en dos direcciones diferentes de células recientemente diferenciadas (células hematopoyéticas y angioblásticas), para la producción de la angiogénesis

y vasculogénesis, las cuales darán origen a los componentes vasculares (63). Se ha descrito que, durante el embarazo humano normal, las series de células hematopoyéticas y angioblásticas se pueden observar alrededor del día 20 posterior a la concepción. Durante el embarazo, el VEGF y sus receptores, especialmente el VEGFR-2, se expresan principalmente en las células hemangiogénicas (24,72). Más aún, las mutaciones genéticas del VEGFR-2 en ratones revelan que este receptor es necesario para la migración de las células hemangiogénicas a los sitios embrionarios, pero no para la hematopoyesis misma (73).

Durante el desarrollo de las vellosidades placentarias, la vasculogénesis primitiva es guiada por el VEGF y sus receptores. En un principio, el VEGF es principalmente expresado por la lámina del citotrofoblasto de la vellosidad y las células precursoras angiogénicas diferenciadas (24). Esto sugiere una inducción paracrina de la vasculogénesis y angiogénesis dependiente del trofoblasto. Debido a este proceso, los patrones vasculares primitivos y las células precursoras angiogénicas aparecen como unidades reconocibles, como contactos intercelulares y acúmulos de células angiogénicas. Esto es seguido por los procesos de diferenciación y proliferación que llevan a la formación de los patrones vasculares (74). Se ha sugerido que toda la proliferación y diferenciación es controlada por mecanismos combinados del microambiente regulado por la transcripción de genes específicos que promueven la supervivencia de ciertos tipos celulares (64,65). Durante el desarrollo de los patrones vasculares, la organización y función de la mayoría de las vellosidades son continuamente modificadas. Se conoce que la formación de túbulos vasculares en las etapas sucesivas, además de ejecutar un programa de desarrollo diferente en cada etapa, es esencial para el establecimiento de las redes vasculares en el árbol velloso placentario (75).

Durante esta formación *de novo*, existe la necesidad de un primer activador para inducir la diferenciación de las fuentes celulares primarias, células mesenquimales pluripotenciales. Debido a que la vasculogénesis placentaria ocurre en ausencia de endotelio ya formado, las células endoteliales maduras preexistentes, y también las células precursoras endoteliales circulantes, no son necesarias para la vasculogénesis placentaria (76).

### **Hipoxia y factores de crecimiento angiogénico en la placenta**

Numerosos factores de crecimiento angiogénico

o inhibidores se producen en la placenta. Sin embargo, los datos longitudinales de las proteínas inmunorreactivas o el ARN mensajero están disponibles solo en un pequeño número en las biopsias de tejidos. Se debe ser cuidadoso al interpretar las mediciones de las concentraciones séricas de VEGF, PIGF y VEGFR-1 que han sido determinadas durante el embarazo y en algunas complicaciones del mismo (77). Varios estudios han descrito la presencia de VEGF mientras que la mayoría de los estudios han medido el VEGF libre (no unido al VEGFR-1). Se ha detectado poca o ninguna cantidad de VEGF. Los estudios que determinaron las concentraciones totales de VEGF encontraron un incremento gradual durante el embarazo (78,79). Estos resultados son consistentes con la producción por la placenta de grandes cantidades de sVEGFR-1 (80). Los resultados de las mediciones de PIGF durante el embarazo son difíciles de interpretar, por la presencia de un receptor soluble. Sin embargo, en embarazos normales existe un marcado incremento del PIGF libre detectable, con un pico entre las 28-32 semanas (81,82). Las mediciones cuantitativas del receptor soluble son más limitadas pero según los datos disponibles parece aumentar aproximadamente seis veces entre las 26-30 semanas (5).

Las mediciones directas de pO<sub>2</sub> en el espacio intervelloso demuestran un marcado incremento a las 11-12 semanas de gestación. Sin embargo, en ese momento no se observa el cambio abrupto en las concentraciones de los factores de crecimiento o sus inhibidores. Se ha sugerido que la regulación de esos factores es determinada por hechos adicionales, aunque el oxígeno y el estrés oxidativo pueden modificar las concentraciones de algunos de ellos. Adicionalmente, se debe reevaluar la tendencia por la cual los tejidos se tornan hipóxicos y la severidad, que sería necesaria para catalogarla como una respuesta típica hacia la hipoxia (5). Por ejemplo, existe evidencia de que los tejidos obtenidos durante el primer trimestre y al término del embarazo responden diferente *in vitro*, a las alteraciones en las concentraciones de oxígeno (83).

### **Regulación molecular y morfología de la vasculogénesis y angiogénesis en las complicaciones del embarazo**

Estudios *in vitro* han demostrado que las células del trofoblasto responden a la reducción de la tensión de oxígeno por activación del VEGF, de sus dos receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 y disminución de la secreción de PIGF (84,85). Se conoce que la

hipoxia disminuye la producción de ciertos factores anti-angiogénicos (principalmente la endostatina, un potente factor angiostático derivado del colágeno XVIII) por células endoteliales microvasculares y pericitos (86).

La eritropoyetina regula la eritropoyesis durante la vida fetal y el único estímulo conocido para su producción es la disminución de las presiones parciales de oxígeno (87). Las concentraciones de eritropoyetina, y otros elementos hematológicos asociados con el aumento de la eritropoyesis (incluyendo hematocrito, concentración de hemoglobina y proporción de hemoglobina F) están elevadas en las muestras de sangre de cordón umbilical de varias patologías durante el embarazo, incluyendo aquellas asociadas a la restricción del crecimiento intrauterino del feto, preeclampsia, anemia materna y diabetes mellitus (88-90).

Aunque establecer la relación causal en humanos es difícil, las alteraciones en el desarrollo vascular placentario pueden ser evidentes por las alteraciones de varios factores angiogénicos y en la morfología de las vellosidades y sus capilares (5,28). Dada su potencia en la estimulación de eventos importantes en la vasculogénesis y angiogénesis, se ha prestado especial interés a la VEGF-A, PIGF, FGF-2, angiopoyetinas y factores inducibles por la hipoxia (HIF-1 y HIF-2). Los cambios morfológicos pueden afectar las ramificaciones y dimensiones de los capilares (volumen total, superficie, longitud y diámetro promedio), la capilarización vellosa (volumen relativo, superficie y longitud) y el desarrollo del árbol vellosa (28).

### **Efectos de la preeclampsia sobre la vasculogénesis y angiogénesis**

La preeclampsia es la principal causa de morbilidad y mortalidad perinatal. Aunque su etiología es desconocida, la regulación del crecimiento vascular en la unidad materno fetal está alterada, llevando a defectos de la placentación (91-94). Se ha demostrado que existe una correlación positiva entre la presencia de lesiones vasculares uteroplacentarias y lesiones relacionadas de las vellosidades (ausencia de vasos, vilitis crónica, endovasculitis hemorrágica) y preeclampsia (95).

Se debe ser cauteloso al interpretar los resultados de los estudios de embarazos complicados con preeclampsia. Es importante establecer cuidadosamente el tiempo de aparición de la preeclampsia y la presencia o no de alteraciones vasculares en las arterias umbilicales.

Desafortunadamente, pocos estudios han suministrado el grado de afección y la acertada selección de las pacientes desde el punto de vista de diagnóstico de la preeclampsia.

La preeclampsia pertenece a un tipo de hipoxia uteroplacentaria, pues está asociada con hipoxia isquémica, en la cual el flujo de sangre al espacio intervilloso se ve comprometido por eventos que se inician tempranamente en el embarazo, cuando se produce una invasión trofoblástica deficiente de las arterias endometriales. Como resultado, las vellosidades son pocas en cantidad y calidad, esto se ve agravado por la disminución de la perfusión y oxigenación. En la preeclampsia, esta variabilidad puede llevar a lesiones de isquemia/reperfusión que afecta el trofoblasto y el endotelio vascular (96).

Sobre la base de los cambios esperados en el embarazo normal, se podría predecir que la expresión de los HIF y VEGF sería normal o elevada antes de la mitad de la gestación o al término del embarazo, mientras que las concentraciones de PIGF estarían reducidas, especialmente en la segunda mitad de la gestación. Debido a la disminución de la  $pO_2$ , el VEGF aumenta la expresión del ARN mensajero de Ang-2, pero no la expresión de Ang-1 o las concentraciones del receptor Tie-2; y también se esperaría la alteración de la relación de ARN mensajero de Ang-1 / Ang-2 (97,98). Existe evidencia que el HIF-1 y HIF-2 están sobre-expresados en la preeclampsia (99), y esto puede ser debido a una reducción dependiente de la alteración del oxígeno (100) o a la acción de los inductores de HIF-1 no influidos por la hipoxia (77,101). Existen problemas potenciales para la medición de las concentraciones de VEGF en la circulación (77), lo que puede ser explicado, en parte, por algunas inconsistencias en la literatura. Por ejemplo, el VEGF es almacenado y liberado de las plaquetas (102). Además, diferentes investigaciones no han tomado en cuenta la interacción con el sVEGFR-1 o las interacciones entre el VEGF y el PIGF. Se han encontrado concentraciones elevadas de VEGF en el suero y plasma de algunas preeclámpticas (103,104) pero no en otras (105,106). En los estudios donde las concentraciones están elevadas, se correlacionan con la severidad de la hipertensión (107). Más aún, las concentraciones pueden ser anormalmente altas en la mitad del embarazo (108) pero no antes (103).

En la placenta a término, se ha reportado las concentraciones de VEGF y sVEGFR-1 como más altas, sin alteraciones o más baja con respecto a los controles normotensos de la misma edad gestacional (85,109,110). Se han encontrado

inconsistencias similares en embarazos complicados con restricción del crecimiento intrauterino del feto donde la expresión tisular de VEGF puede estar sin alteraciones o reducidas (111-113) y la expresión de VEGFR-1 está aumentada (109). En la preeclampsia, las concentraciones de ARN mensajero del VEGF están aumentadas al término del embarazo (114). En placentas que muestran cambios asociados a hipoxia - isquemia, existe un aumento en la expresión del VEGF y sus receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 (115).

Se ha reportado que la expresión tisular de PIGF está elevada (115) o disminuida (101) en la preeclampsia, pero las concentraciones en la circulación materna al término del embarazo pueden ser menores (81,82,105,106,109). La expresión de la PIGF placentaria también se ha reportado más baja en la hipertensión inducida por el embarazo (116). En las preeclámpticas, la disminución de las concentraciones séricas puede estar presente antes de las 20 semanas (117,118), aunque su valor como marcador temprano es controversial (119). También existe una disminución de la expresión del ARN mensajero de la Ang-2, pero no del ARN mensajero del Ang-1 (120). Sin embargo, las concentraciones de ARN mensajero y sus respectivas proteínas no están alterados en forma significativa en las preeclámpticas (114). Un aparente incremento del ARN mensajero del Ang-2 se consideró no significativo.

Hallazgos recientes sugieren que el exceso de kinasa de tirosina soluble similar al FMS o sVEGFR-1, un antagonista del VEGF y PIGF, puede contribuir a la patogénesis de la preeclampsia (121,122). El sVEGFR-1 circulante es probablemente de origen placentario y está asociada con disminución de las concentraciones circulantes de VEGF y PIGF. Más aún, la administración a ratas embarazadas induce signos de preeclampsia, incluyendo hipertensión y proteinuria (122). Desgraciadamente, la suposición que los efectos del sVEGFR-1 podría influir la actividad del VEGF sobre la formación vascular no parece ser consonante con el mantenimiento de los volúmenes normales en las capilares fetales durante la preeclampsia (123). La expresión tisular de sVEGFR-1 está elevada en la hipertensión inducida por el embarazo (116).

Otro factor de crecimiento que es tanto mitogénico como angiogénico es el FGF-2. Las concentraciones maternas y fetales de FGF-2 alcanzan su pico a las 28-31 semanas y a las 18-20 semanas del embarazo normal, respectivamente, para luego disminuir (124). En la hipertensión inducida por el embarazo, se encuentran altas concentraciones séricas maternas

elevadas de FGF-2 pero no ayuda a diferenciar entre preeclampsia leve y severa (125) o tiene utilidad como indicador pronóstico (126). La angiogenina es un potente inductor de la neovascularización pero su papel en las complicaciones del embarazo es desconocido. La expresión y liberación de angiogenina por explantes de placenta humana, y las concentraciones plasmáticas maternas, se incrementan entre el primer trimestre y el término del embarazo (127,128). Sin embargo, no se han encontrado diferencias en pacientes con preeclampsia (129).

Se ha observado que en la preeclampsia existe un incremento de las ramificaciones angiogénicas. Pero se asocia con crecimiento normal o disminuido de los capilares (123,130); sin embargo, en la preeclampsia asociada a restricción del crecimiento intrauterino de feto, esta reducción del volumen y superficie de los capilares puede ser más severa (123,131).

Estudios recientes que han separado a los grupos de pacientes con preeclampsia, preeclampsia más restricción del crecimiento intrauterino del feto y restricción del crecimiento intrauterino del feto, han enfatizado que los cambios en el segundo grupo son probablemente debidos a la restricción del crecimiento intrauterino del feto que a la preeclampsia (123). También se ha enfatizado la necesidad de distinguir claramente entre los tres grupos de complicaciones. A pesar de la reducción del crecimiento de los capilares, la capilarización de las vellosidades se mantiene o aumenta. Hasta el momento, no existen datos cuantitativos sobre el número de células endoteliales, vasos o remodelación celular. Un incremento de la incidencia de ramificaciones angiogénicas explicaría las malformaciones características de la vellosidad terminal, caracterizada por superficies de las vellosidades con múltiples roturas que le dan forma de nudo (28,132). Las secciones histológicas muestran grupos de vellosidades terminales con puentes y brote angiogénico sincitial, pero estas impresiones están influidas por la sección tangencial de las superficies de las vellosidades irregulares.

La oxigenación placentaria es un factor importante para el control de los factores de crecimiento angiogénico y, por tanto para la angiogénesis y vasculogénesis fetoplacentaria y la diferenciación de las vellosidades. Pero las interacciones entre los procesos moleculares subyacentes y su integración espacio-tiempo aún deben seguir siendo estudiados. Los datos disponibles sugieren que las concentraciones de VEGF pueden estar elevadas en la circulación materna secundaria a hipoxia uteroplacentaria. Un patrón contrario ha sido observado en las

concentraciones de PIGF y Ang-2. Si estos hallazgos se confirman, explicaría porqué los factores que inducen hipoxia uteroplacentaria (y en específico la preeclampsia) afectarían los patrones de maduración y, la extensión de la vasculogénesis y la angiogénesis.

### REFERENCIAS

- Zygmunt M, Herr F, Münstedt K, Lang U, Liang O. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003;110(Suppl):10-18.
- Ribatti D, Vacca A, Nico B, Ria R, Dammacco F. Cross-talk between hematopoiesis and angiogenesis signaling pathways. *Curr Mol Med.* 2002;2:537-543.
- Gupta M, Qin R. Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World J Gastroenterol.* 2003;9:1144-1155.
- Cogle C, Scott E. The hemangioblast: Cradle to clinic. *Exp Hematol.* 2004;32:885-890.
- Charnock-Jones D, Kaufmann P, Mayhew T. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. *Placenta.* 2004;25:103-113.
- Pardanaud L, Luton D, Prigent M, Bourcheix L, Catala M, Dieterlen-Lievre F. Two distinct endothelial lineages in ontogeny, one of them related to hemopoiesis. *Development.* 1996;122:1363-1371.
- Bauer S, Bauer R, Velazquez O. Angiogenesis, vasculogenesis, and induction of healing in chronic wounds. *Vasc Endovascular Surg.* 2005;39:293-306.
- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: Basic science and clinical progress. *Endocr Rev.* 2004;25:581-611.
- Dvorak H, Brown L, Detmar M, Dvorak A. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol.* 1995;146:1029-1039.
- Celik-Ozenci C, Akkoyunlu G, Kayisli U, Arici A, Demir R. Localization of vascular endothelial growth factor in the zona pellucida of developing ovarian follicles in the rat: A possible role in destiny of follicles. *Histochem Cell Biol.* 2003;120:383-390.
- Celik-Ozenci C, Akkoyunlu G, Korgun E, Savas B, Demir R. Expressions of VEGF and its receptors in rat corpus luteum during interferon alpha administration in early and pseudopregnancy. *Mol Reprod Dev.* 2004;67:414-423.
- Kingdom J, Huppertz B, Seaward G, Kaufmann P. Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2000;92:35-43.
- DiSalvo J, Bayne M, Conn G, Kwok P, Trivedi P, Soderman D, et al. Purification and characterization of a naturally occurring vascular endothelial growth factor/placenta growth factor heterodimer. *J Biol Chem.* 1995;270:7717-7723.
- Yabushita H, Shimazu M, Noguchi M, Kishida T, Narumiya H, Sawaguchi K, et al. Vascular endothelial growth factor activating matrix metalloproteinase in ascitic fluid during peritoneal dissemination of ovarian cancer. *Oncol Rep.* 2003;10:89-95.
- Lohela M, Bry M, Tammela T, Alitalo K. VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* 2009;21:154-165.
- Bogic L, Brace R, Cheung C. Developmental expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors and VEGF binding in ovine placenta and fetal membranes. *Placenta.* 2001;22:265-275.
- Gargett C, Lederman F, Lau T, Taylor N, Rogers P. Lack of correlation between vascular endothelial growth factor production and endothelial cell proliferation in the human endometrium. *Hum Reprod.* 1999;14:2080-2088.
- Ahmed A, Dunk C, Ahmad S, Khaliq A. Regulation of placental vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PlGF) and soluble Flt-1 by oxygen--a review. *Placenta.* 2000;21(Suppl):16-24.
- Weisz A, Koren B, Cohen T, Neufeld G, Kleinberger T, Lewis B, et al. Increased vascular endothelial growth factor 165 binding to kinase insert domain-containing receptor after infection of human endothelial cells by recombinant adenovirus encoding the Vegf(165) gene. *Circulation.* 2001;103:1887-1892.
- Breier G. Angiogenesis in embryonic development -a review. *Placenta.* 2000;21(Suppl):11-15.
- Hiratsuka S, Nakao K, Nakamura K, Katsuki M, Maru Y, Shibuya M. Membrane fixation of vascular endothelial growth factor receptor 1 ligand-binding domain is important for vasculogenesis and angiogenesis in mice. *Mol Cell Biol.* 2005;25:346-354.
- Sawano A, Takahashi T, Yamaguchi S, Aonuma M, Shibuya M. Flt-1 but not KDR/Flk-1 tyrosine kinase is a receptor for placenta growth factor, which is related to vascular endothelial growth factor. *Cell Growth Differ.* 1996;7:213-221.
- Rossant J, Howard L. Signaling pathways in vascular development. *Ann Rev Cell Dev Biol.* 2002;18:541-573.
- Demir R, Kayisli U, Seval Y, Celik-Ozenci C, Korgun E, Demir-Weusten A, et al. Sequential expression of VEGF and its receptors in human placental villi during very early pregnancy: Differences between placental vasculogenesis and angiogenesis. *Placenta.* 2004;25:560-572.
- 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;27:648-659.
- Zhang L, Yang N, Park J, Katsaros D, Fracchioli S, Cao G, et al. Tumor-derived vascular endothelial growth factor up-regulates angiopoietin-2 in host endothelium and destabilizes host vasculature, supporting angiogenesis in ovarian cancer. *Cancer*

- Res. 2003;63:1303-1342.
27. Fujiyama S, Matsubara H, Nozawa Y, Maruyama K, Mori Y, Tsutsumi Y, et al. Angiotensin AT(1) and AT(2) receptors differentially regulate angiopoietin-2 and vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis by modulating heparin binding-epidermal growth factor (EGF)-mediated EGF receptor transactivation. *Circ Res.* 2001;88:22-29.
  28. Kaufmann P, Mayhew T, Charnock-Jones D. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. *Placenta.* 2004;25:114-126.
  29. Leach L, Babawale M, Anderson M, Lammiman M. Vasculogenesis, angiogenesis and the molecular organisation of endothelial junctions in the early human placenta. *J Vasc Res.* 2002;39:246-259.
  30. Mayhew T, Charnock-Jones D, Kaufmann P. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. III. Changes in complicated pregnancies. *Placenta.* 2004;25:127-139.
  31. Gu B, Alexander J, Gu Y, Zhang Y, Lewis D, Wang Y. Expression of lymphatic vascular endothelial hyaluronan receptor-1 (LYVE-1) in the human placenta. *Lymphat Res Biol.* 2006;4:11-17.
  32. Wright T, Leach L, Shaw P, Jones P. Dynamics of vascular endothelial-cadherin and beta-catenin localization by vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in human umbilical vein cells. *Exp Cell Res.* 2002;280:159-168.
  33. Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhues A, Waltenberger J, Augustin H, Ziche M, et al. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* 1999;18:363-374.
  34. Paavonen K, Mandelin J, Partanen T, Jussila L, Li TF, Ristimaki A, et al. Vascular endothelial growth factors C and D and their VEGFR-2 and 3 receptors in blood and lymphatic vessels in healthy and arthritic synovium. *J Rheumatol.* 2002;29:39-45.
  35. Schuh A, Faloon P, Hu Q, Bhimani M, Choi K. In vitro hematopoietic and endothelial potential of flk-1(-/-) embryonic stem cells and embryos. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:2159-2164.
  36. Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 1998;95:9349-9354.
  37. Fong G, Zhang L, Bryce D, Peng J. Increased heman-gioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development.* 1999;126:3015-3025.
  38. Harris L, Jones C, Aplin J. Adhesion molecules in human trophoblast - a review. II. extravillous trophoblast. *Placenta.* 2009;30:299-304.
  39. Bowen J, Hunt J. The role of integrins in reproduction. *Proc Soc Exp Biol Med.* 2000;223:331-343.
  40. Irving J, Lala P. Functional role of cell surface integrins on human trophoblast cell migration: Regulation by TGF-beta, IGF-II, and IGFBP-1. *Exp Cell Res.* 1995;217:419-427.
  41. Espinoza J, Romero R, Mee Kim Y, Kusanovic J, Hassan S, Erez O, et al. Normal and abnormal transformation of the spiral arteries during pregnancy. *J Perinat Med.* 2006;34:447-458.
  42. Hannan N, Salamonsen L. CX3CL1 and CCL14 regulate extracellular matrix and adhesion molecules in the trophoblast: Potential roles in human embryo implantation. *Biol Reprod.* 2008;79:58-65.
  43. Friesel R, Maciag T. Fibroblast growth factor prototype release and fibroblast growth factor receptor signaling. *Thromb Haemost.* 1999;8:748-754.
  44. Ornitz D. FGFs, heparan sulfate and FGFRs: Complex interactions essential for development. *Bioessays.* 2000;22:108-112.
  45. Thurston G. Complementary actions of VEGF and angiopoietin-1 on blood vessel growth and leakage. *J Anat.* 2002;200:575-580.
  46. Hayes A, Huang W, Mallah J, Yang D, Lippman M, Li L. Angiopoietin-1 and its receptor Tie-2 participate in the regulation of capillary-like tubule formation and survival of endothelial cells. *Microvasc Res.* 1999;58:224-237.
  47. Dunk C, Shams M, Nijjar S, Rhaman M, Qiu Y, Bussolati B, 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.
  48. O'Reilly M. Angiostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and of tumor growth. *EXS.* 1997;79:273-294.
  49. Sheibani N, Frazier W. Thrombospondin-1, PECAM-1, and regulation of angiogenesis. *Histol Histopathol.* 1999;14:285-294.
  50. Jain R. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med.* 2003;9:685-693.
  51. Lacaud G, Robertson S, Palis J, Kennedy M, Keller G. Regulation of hemangioblast development. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;938:96-107.
  52. Sinclair A, Götting B, Barton L, Stanley M, Pardanaud L, Klaine M, et al. Distinct 5' SCL enhancers direct transcription to developing brain, spinal cord, and endothelium: Neural expression is mediated by GATA factor binding sites. *Dev Biol.* 1999;209:128-142.
  53. Shalaby F, Ho J, Stanford W, Fischer K, Schuh A, Schwartz L, et al. A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell.* 1997;89:981-990.
  54. Agah R, Prasad K, Linnemann R, Firpo M, Quertermous T, Dichek D. Cardiovascular overexpression of transforming growth factor-beta(1) causes abnormal yolk sac vasculogenesis and early embryonic death. *Circ Res.* 2000;86:1024-1030.
  55. Rafii S, Meeus S, Dias S, Hattori K, Heissig B, Shmelkov S, et al. Contribution of marrow-derived

- progenitors to vascular and cardiac regeneration. *Semin Cell Dev Biol.* 2002;13:61-67.
56. Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med.* 2003;9:702-712.
  57. Augustin H. Tubes, branches, and pillars: The many ways of forming a new vasculature. *Circ Res.* 2001;89:645-647.
  58. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003;9:653-660.
  59. Cleaver O, Melton D. Endothelial signaling during development. *Nat Med.* 2003;9:661-668.
  60. Kishimoto J, Ehama R, Ge Y, Kobayashi T, Nishiyama T, Detmar M, et al. In vivo detection of human vascular endothelial growth factor promoter activity in transgenic mouse skin. *Am J Pathol.* 2000;157:103-110.
  61. Odorisio T, Schietroma C, Zaccaria M, Cianfarani F, Tiveron C, Tatangelo L, et al. Mice overexpressing placenta growth factor exhibit increased vascularization and vessel permeability. *J Cell Sci.* 2002;115:2559-2567.
  62. Veikkola T, Jussila L, Makinen T, Karpanen T, Jeltsch M, Petrova T, et al. Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. *EMBO J.* 2001;20:1223-1231.
  63. Davidson A, Zon L. Turning mesoderm into blood: The formation of hematopoietic stem cells during embryogenesis. *Curr Top Dev Biol.* 2000;50:45-60.
  64. Traver D, Zon L. Walking the walk: Migration and other common themes in blood and vascular development. *Cell.* 2002;108:731-734.
  65. Thisse C, Zon L. Organogenesis-heart and blood formation from the zebrafish point of view. *Science.* 2002;295:457-462.
  66. Yoder M. Embryonic hematopoiesis in mice and humans. *Acta Paediatr Suppl.* 2002;91:5-8.
  67. Demir R, Kayisli U, Cayli S, Huppertz B. Sequential steps during vasculogenesis and angiogenesis in the very early human placenta. *Placenta.* 2006;27:535-539.
  68. Herr F, Baal N, Zygmunt M. Studies of placental vasculogenesis: A way to understand pregnancy pathology? *Z Geburtshilfe Neonatol.* 2009;213:96-100.
  69. Cervar M, Blaschitz A, Dohr G, Desoye G. Paracrine regulation of distinct trophoblast functions in vitro by placental macrophages. *Cell Tissue Res.* 1999;295:297-305.
  70. Demir R, Kaufmann P, Castellucci M, Erben T, Kotowski A. Fetal vasculogenesis and angiogenesis in human placental villi. *Acta Anat (Basel).* 1989;136:190-203.
  71. Matsubara S, Takayama T, Iwasaki R, Komatsu N, Matsubara D, Takizawa T, et al. Enzyme-cytochemically detectable glucose-6-phosphate dehydrogenase in human villous macrophages (Hofbauer cells). *Placenta.* 2001;22:882-885.
  72. Park C, Afrikanova I, Chung Y, Zhang W, Arentson E, Fong G, et al. A hierarchical order of factors in the generation of FLK1- and SCL-expressing hematopoietic and endothelial progenitors from embryonic stem cells. *Development.* 2004;131:2749-2762.
  73. Hidaka M, Stanford W, Bernstein A. Conditional requirement for the Flk-1 receptor in the in vitro generation of early hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 1999;96:7370-7375.
  74. Sati L, Seval Y, Yasemin Demir A, Kosanke G, Kohnen G, Demir R. Cellular diversity of human placental stem villi: An ultrastructural and immunohistochemical study. *Acta Histochem.* 2007;109:468-479.
  75. Umeda P, Kavinsky C, Sinha A, Hsu H, Jakovcic S, Rabinowitz M. Cloned mRNA sequences for two types of embryonic myosin heavy chains from chick skeletal muscle. II. Expression during development using S1 nuclease mapping. *J Biol Chem.* 1983;258:5206-5214.
  76. Eichmann A, Pardanaud L, Yuan L, Moyon D. Vasculogenesis and the search for the hemangioblast. *J Hematother Stem Cell Res.* 2002;11:207-214.
  77. Jelkmann W. Pitfalls in the measurement of circulating vascular endothelial growth factor. *Clin Chem.* 2001;47:617-623.
  78. Sharkey A, Cooper J, Balmforth J, McLaren J, Clark D, Charnock-Jones D, et al. Maternal plasma levels of vascular endothelial growth factor in normotensive pregnancies and in pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Eur J Clin Invest.* 1996;26:1182-1185.
  79. Evans P, Wheeler T, Anthony F, Osmond C. A longitudinal study of maternal serum vascular endothelial growth factor in early pregnancy. *Hum Reprod.* 1998;13:1057-1062.
  80. Chen H, Ikeda U, Shimpo M, Maeda Y, Shibuya M, Ozawa K, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor activity by transfection with the soluble FLT-1 gene. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000;36:498-502.
  81. Tidwell S, Ho H, Chiu W, Torry R, Torry D. Low maternal serum levels of placenta growth factor as an antecedent of clinical preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;184:1267-1272.
  82. Chappell L, Seed P, Briley A, Kelly F, Hunt B, Charnock-Jones D, et al. A longitudinal study of biochemical variables in women at risk of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;187:127-136.
  83. Tseng J, Hsu S, Ho E, Hsieh Y, Wen M, Chou M. Differential expression of angiopoietin-1, angiopoietin-2, and Tie receptors in placentas from pregnancies complicated by placenta accreta. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;194:564-571.
  84. Munaut C, Lorquet S, Pequeux C, Blacher S, Berndt S, Frankenne F, et al. Hypoxia is responsible for soluble vascular endothelial growth factor receptor-1

- (VEGFR-1) but not for soluble endoglin induction in villous trophoblast. *Hum Reprod.* 2008;23:1407-1415.
85. Trollmann R, Amann K, Schoof E, Beinder E, Wenzel D, Rascher W, et al. Hypoxia activates the human placental vascular endothelial growth factor system in vitro and in vivo: Up-regulation of vascular endothelial growth factor in clinically relevant hypoxic ischemia in birth asphyxia. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;188:517-523.
  86. Wu P, Yonekura H, Li H, Nozaki I, Tomono Y, Naito I, et al. Hypoxia down-regulates endostatin production by human microvascular endothelial cells and pericytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;288:1149-1154.
  87. Costa-Giomi P, Caro J, Weinmann R. Enhancement by hypoxia of human erythropoietin gene transcription in vitro. *J Biol Chem.* 1990;265:10185-10188.
  88. Gruslin A, Perkins S, Manchanda R, Fleming N, Clinch J. Maternal smoking and fetal erythropoietin levels. *Obstet Gynecol.* 2000;95:561-564.
  89. Erdem A, Erdem M, Arslan M, Yazici G, Eskandari R, Himmetoglu O. The effect of maternal anemia and iron deficiency on fetal erythropoiesis: Comparison between serum erythropoietin, hemoglobin and ferritin levels in mothers and newborns. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2002;11:329-332.
  90. Mamopoulos M, Bili H, Tsantali C, Assimakopoulos E, Mantalenakis S, Farmakides G. Erythropoietin umbilical serum levels during labor in women with preeclampsia, diabetes, and preterm labor. *Am J Perinatol.* 1994;11:427-429.
  91. Reyna E, Briceño C, Torres D. Inmunología, inflamación y preeclampsia. *Rev Obstet Ginecol Venez.* 2009;69:97-110.
  92. Serrano N. Immunology and genetic of preeclampsia. *Clin Dev Immunol.* 2006;13:197-201.
  93. Briceño-Pérez C, Briceño-Sanabria L, Vigil-De Gracia P. Prediction and prevention of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 2009;28:138-155.
  94. Salafia C, Pezzullo J, López-Zeno J, Simmens S, Minior V, Vintzileos A. Placental pathologic features of preterm preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1995;173:1097-1105.
  95. Salafia C, Minior V, López-Zeno J, Whittington S, Pezzullo J, Vintzileos A. Relationship between placental histologic features and umbilical cord blood gases in preterm gestations. *Am J Obstet Gynecol.* 1995;173:1058-1064.
  96. Belkacemi L, Bainbridge S, Dickinson M, Smith G, Graham C. Glyceryl trinitrate inhibits hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in the syncytiotrophoblast of the human placenta: Therapeutic implications for preeclampsia. *Am J Pathol.* 2007;170:909-920.
  97. Oh H, Takagi H, Suzuma K, Otani A, Matsumura M, Honda Y. Hypoxia and vascular endothelial growth factor selectively up-regulate angiopoietin-2 in bovine microvascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 1999;274:15732-15739.
  98. 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.
  99. Rajakumar A, Whitelock K, Weissfeld L, Daftary A, Markovic N, Conrad K. Selective overexpression of the hypoxia-inducible transcription factor, HIF-2alpha, in placentas from women with preeclampsia. *Biol Reprod.* 2001;64:499-506.
  100. El Awad B, Kreft B, Wolber E, Hellwig-Bürgel T, Metzen E, Fandrey J, et al. Hypoxia and interleukin-1beta stimulate vascular endothelial growth factor production in human proximal tubular cells. *Kidney Int.* 2000;58:43-50.
  101. Torry D, Mukherjea D, Arroyo J, Torry R. Expression and function of placenta growth factor: Implications for abnormal placentation. *J Soc Gynecol Investig.* 2003;10:178-188.
  102. Webb N, Bottomley M, Watson C, Brenchley P. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is released from platelets during blood clotting: Implications for measurement of circulating VEGF levels in clinical disease. *Clin Sci (Lond).* 1998;94:395-404.
  103. Hunter A, Aitkenhead M, Caldwell C, McCracken G, Wilson D, McClure N. Serum levels of vascular endothelial growth factor in preeclamptic and normotensive pregnancy. *Hypertension.* 2000;36:965-969.
  104. El-Salahy E, Ahmed M, El-Gharieb A, Tawfik H. New scope in angiogenesis: Role of vascular endothelial growth factor (VEGF), NO, lipid peroxidation, and vitamin E in the pathophysiology of preeclampsia among Egyptian females. *Clin Biochem.* 2001;34:323-329.
  105. Reuvekamp A, Velsing-Aarts F, Poulina I, Capello J, Duits A. Selective deficit of angiogenic growth factors characterises pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol.* 1999;106:1019-1022.
  106. Livingston J, Chin R, Haddad B, McKinney E, Ahokas R, Sibai B. Reductions of vascular endothelial growth factor and placental growth factor concentrations in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;183:1554-1557.
  107. Bosio P, Wheeler T, Anthony F, Conroy R, O'herlihy C, McKenna P. Maternal plasma vascular endothelial growth factor concentrations in normal and hypertensive pregnancies and their relationship to peripheral vascular resistance. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;184:146-152.
  108. Kupfermanc M, Daniel Y, Englander T, Baram A, Many A, Jaffa A, et al. Vascular endothelial growth factor is increased in patients with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 1997;38:302-306.
  109. Helske S, Vuorela P, Carpén O, Hornig C, Weich H, Halmesmäki E. Expression of vascular endothelial

- growth factor receptors 1, 2 and 3 in placentas from normal and complicated pregnancies. *Mol Hum Reprod.* 2001;7:205-210.
110. Ranheim T, Staff A, Henriksen T. VEGF mRNA is unaltered in decidual and placental tissues in preeclampsia at delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2001;80:93-98.
  111. Lyall F, Young A, Boswell F, Kingdom J, Greer I. Placental expression of vascular endothelial growth factor in placentae from pregnancies complicated by pre-eclampsia and intrauterine growth restriction does not support placental hypoxia at delivery. *Placenta.* 1997;18:269-276.
  112. Lash G, MacPherson A, Liu D, Smith D, Charnock-Jones S, Baker P. Abnormal fetal growth is not associated with altered chorionic villous expression of vascular endothelial growth factor mRNA. *Mol Hum Reprod.* 2001;7:1093-1098.
  113. Tse J, Lao T, Chan C, Chiu P, Cheung A. Expression of vascular endothelial growth factor in third-trimester placentas is not increased in growth-restricted fetuses. *J Soc Gynecol Investig.* 2001;8:77-82.
  114. 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.
  115. Kumazaki K, Nakayama M, Suehara N, Wada Y. Expression of vascular endothelial growth factor, placental growth factor, and their receptors Flt-1 and KDR in human placenta under pathologic conditions. *Hum Pathol.* 2002;33:1069-1077.
  116. Cho G, Roh G, Kim H, Kim Y, Cho S, Choi W, et al. Differential expression of placenta growth factors and their receptors in the normal and pregnancy-induced hypertensive human placentas. *J Korean Med Sci.* 2003;18:402-408.
  117. Tidwell S, Ho H, Chiu W, Torry R, Torry D. Low maternal serum levels of placenta growth factor as an antecedent of clinical preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;184:1267-1272.
  118. Romero R, Nien J, Espinoza J, Todem D, Fu W, Chung H, et al. A longitudinal study of angiogenic (placental growth factor) and anti-angiogenic (soluble endoglin and soluble vascular endothelial growth factor receptor-1) factors in normal pregnancy and patients destined to develop preeclampsia and deliver a small for gestational age neonate. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2008;21:9-23.
  119. Espinoza J, Romero R, Nien J, Gomez R, Kusanovic P, Gonçalves L, et al. Identification of patients at risk for early onset and/or severe preeclampsia with the use of uterine artery Doppler velocimetry and placental growth factor. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;196:326.e1-13.
  120. Charnock-Jones D. Soluble flt-1 and the angiopoietins in the development and regulation of placental vasculature. *J Anat.* 2002;200:607-615.
  121. Koga K, Osuga Y, Yoshino O, Hirota Y, Ruimeng X, Hirata T, et al. Elevated serum soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 (sVEGFR-1) levels in women with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:2348-2351.
  122. Maynard S, Min J, Merchan J, Lim K, Li J, Mondal S, Libermann T, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest.* 2003;111:649-658.
  123. Mayhew T, Ohadike C, Baker P, Crocker I, Mitchell C, Ong S. Stereological investigation of placental morphology in pregnancies complicated by preeclampsia with and without intrauterine growth restriction. *Placenta.* 2003;24:219-226.
  124. Arany E, Hill D. Fibroblast growth factor-2 and fibroblast growth factor receptor-1 mRNA expression and peptide localization in placentae from normal and diabetic pregnancies. *Placenta.* 1998;19:133-142.
  125. Hohlagschwandtner M, Knöfler M, Ploner M, Zeisler H, Joura E, Husslein P. Basic fibroblast growth factor and hypertensive disorders in pregnancy. *Hypertens Pregnancy.* 2002;21:235-241.
  126. Kurz C, Hefler L, Zeisler H, Schatten C, Husslein P, Tempfer C. Maternal basic fibroblast growth factor serum levels are associated with pregnancy-induced hypertension. *J Soc Gynecol Investig.* 2001;8:24-26.
  127. Rajashekhar G, Loganath A, Roy A, Wong Y. Expression and localization of angiogenin in placenta: Enhanced levels at term over first trimester villi. *Mol Reprod Dev.* 2002;62:159-166.
  128. Rajashekhar G, Loganath A, Roy A, Wong Y. Over-expression and secretion of angiogenin in intrauterine growth retardation placenta. *Mol Reprod Dev.* 2003;64:397-404.
  129. Kolben M, Bläser J, Ulm K, Schmitt M, Schneider K, Tschesche H, et al. Angiogenin plasma levels during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1997;176:37-41.
  130. Sagol S, Sagol O, Ozdemir N. Stereological quantification of placental villus vascularization and its relation to umbilical artery Doppler flow in intrauterine growth restriction. *Prenat Diagn.* 2002;22:398-403.
  131. Salafia C, Charles A, Maas E. Placenta and fetal growth restriction. *Clin Obstet Gynecol.* 2006;49:236-256.
  132. Hakvoort R, Lisman B, Boer K, Bleker O, van Groningen K, van Wely M, et al. Histological classification of chorionic villous vascularization in early pregnancy. *Hum Reprod.* 2006;21:1291-1294.

Correspondencia a:  
 Hospital Central "Dr. Urquinaona"  
 Final Av. El Milagro. Maracaibo, Estado Zulia.  
 Venezuela. Teléfono: 0416-2605233.  
 E-mail: sippenbauch@gmail.com