



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO**

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

**“EXPRESIÓN DE VEGF Y SUS RECEPTORES EN FOLÍCULOS
DOMINANTES DEL ESTRO Y FOLÍCULOS SANOS Y ATRÉSICOS DEL DÍA
SEIS DEL CICLO ESTRAL”**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

JHONNY MÉNDEZ HERNÁNDEZ

TUTORES:

ANA MARÍA ROSALES TORRES

CARLOS GUILLERMO GUTIÉRREZ AGUILAR

COMITÉ TUTORAL:

FRANCISCO FIERRO FIERRO

MÉXICO, DISTRITO FEDERAL. 2010.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

La Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (F. M. V. Z.) de la Universidad Nacional Autónoma de México (U. N. A. M.) pertenece al padrón de Posgrados de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

El presente trabajo se realizó en:

Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción del Departamento de Producción Agrícola y Animal de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana de la Unidad Xochimilco.

Campo experimental “Las Margaritas” del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP), Heytamalco, Puebla.

Laboratorio de Endocrinología del Departamento de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El autor fue Becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con número de registro **255606**.

La presente tesis fue financiada por el proyecto de SEP-PROMEP Cuerpos Académicos, Aplicación de la Biología Celular y Molecular en el estudio de la Reproducción Animal, línea de estudio generación de conocimiento (LGAC) Procesos Bioquímicos, Celulares y Moleculares de la Maduración y Atresia Folicular de los Mamíferos (UAM-X-CA-20).

Y por CONACYT a través del proyecto financiado: “La Ceramida como Indicador de Atresia Folicular en la Oveja”, convocatoria Ciencia-Básica CONACYT 2005 (REF-50463-Z).

JURADO DE EXAMEN

El jurado asignado por el Comité Académico del Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México aprobó la Tesis que presentó:

M. V. Z. Méndez Hernández Jhonny

Honorable Jurado de Examen:

Presidente.

Dra. Marta Romano Pardo.

Secretario.

Dr. Carlos Guillermo Gutiérrez Aguilar.

Vocal.

Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda.

Suplente.

Dra. Lucía Eliana Rangel Porta.

Suplente.

Dr. Joel Hernández Cerón

DEDICATORIAS

A Dios por que siempre me ha acompañado en el largo camino de la vida “Gracias Señor”.

Al gran apoyo recibido por parte de mi familia, principalmente de mis padres, José Luis Méndez López y Pilar Hernández González, por darme lo mejor de ustedes, apoyo incondicional en los momentos más difíciles y por darme la fortaleza para salir adelante.

A Claudia Fernández Mejía, por ser la persona que me apoyo en todo momento y me dio lo mejores consejos a lo largo de mi formación, además de su apoyo moral y sentimental, lo logramos mi cielo.

A la Dra. Ana María Rosales Torres por ofrecerme todos su experiencia y conocimientos, así como la confianza y apoyo ofrecido para la formación de alumnos de calidad.

Al Dr. Carlos Guillermo Gutiérrez Aguilar por todo el apoyo brindado durante mi formación a lo largo de todo este tiempo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Bioquímica de la Reproducción, por darme su apoyo en todo momento, en especial a la Dra. Marcela Vergara y al Dr. Alejandro Ávalos.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ana María Rosales Torres por su apoyo y dedicación en la realización de esta Maestría.

Al Dr. Carlos Guillermo Gutiérrez Aguilar por todos sus comentarios, aportes e ideas siempre de calidad y de importancia durante mi formación.

Al Dr. Francisco Fierro Fierro por haber aceptado ser parte de mi comité tutorial y por el apoyo técnico en la realización de la tesis.

Al CONACYT por la beca otorgada ya que gracias a ella pude dedicarme de tiempo completo a mis estudios de Maestría.

INDICE GENERAL	PAGINA
DEDICATORIAS	V
AGRADECIMIENTOS	VI
RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
A. DESARROLLO FOLICULAR	3
i. Reclutamiento Inicial	3
<i>Crecimiento folicular</i>	6
<i>Sistema IGF</i>	8
<i>Desarrollo vascular de los folículos ovárico</i>	9
<i>Factor de Crecimiento Endotelio Vascular</i>	13
<i>Receptores de VEGF</i>	16
ii. Reclutamiento Cíclico	19
<i>Oleadas de crecimiento folicular en el bovino</i>	19
<i>Moléculas que participan durante el reclutamiento</i>	20
iii. Selección y moléculas que participan en el proceso	22
iv. Dominancia y moléculas que participan en el proceso	23
<i>Diferenciación de los folículos dominantes</i>	23
v. Atresia	26
<i>Apoptosis en los folículos atrésicos</i>	27
<i>Control hormonal de la atresia folicular</i>	27
<i>Mecanismo molecular de atresia</i>	29
B. RELACIÓN DE VEGF CON HORMONAS PROTEICAS Y ESTEROIDES	32
III. JUSTIFICACIÓN	35

IV.	HIPOTESIS	36
V.	OBJETIVOS	36
	A. Objetivo General	36
	B. Objetivos Específicos	36
VI.	MATERIAL Y MÉTODOS	37
	<i>Lugar de realización</i>	37
	<i>Obtención de Líquido Folicular Libre de Esteroides</i>	37
	<i>Esquema de sincronización de la Ovulación</i>	38
	<i>Muestras de Sangre</i>	39
	<i>Ovariectomía</i>	39
	<i>Tratamiento del Folículo Dominante</i>	39
	<i>Extracción de RNA</i>	40
	<i>Síntesis de cDNA</i>	41
	<i>Oligos y Sondas para la Identificación de los diferentes genes</i>	41
	<i>Amplificación y Purificación de Fragmentos de los Genes para la realización de una Curva Estándar</i>	43
	<i>Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real</i>	45
	<i>Radio Inmuno Ensayo</i>	46
	<i>Análisis Estadístico</i>	46
VII.	RESULTADOS	47
	<i>Concentración de progesterona</i>	47
	<i>Expresión de las Isoformas de VEGF</i>	47
	<i>Expresión de los Receptores de VEGF</i>	48
VIII.	DISCUSIÓN	49
IX.	CONCLUSIONES	58
X.	LITERATURA CITADA	59

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

		PÁGINA
Cuadro 1.	Clasificación de los estados tempranos de crecimiento folicular.	6
Cuadro 2.	Principales factores angiogénicos.	11
Cuadro 3.	Oligos y sondas utilizadas para PCR-Tiempo Real.	42
Figura 1.	Isoformas Angiogénicas y antiangiogénicas del Factor de Crecimiento endotelio Vascular.	16
Figura 2.	Receptores de VEGF.	18
Figura 3.	Diseño Experimental.	38
Figura 4.	Esquema de inducción de ovulación.	38
Figura 5.	Ubicación de oligos y sonda de las isoformas de VEGF.	42
Figura 6.	Ubicación de oligos y sondas de los recptores de VEGF.	43
Figura 7.	Expresión de RNAm de VEGF-120 y VEGF-164 de los grupos D6, D6LF y Estro.	47
Figura 8.	Expresión de RNAm de los Receptores VEGF-R1, VEGF-R2 y sVEGF-R1 de los grupos D6, D6LF y Estro.	48

RESUMEN

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), es uno de los factores más activos en la producción de nuevos vasos sanguíneos en el ovario de los mamíferos. Su expresión se ha identificada en células de la granulosa y teca de folículos en diferentes estadios de desarrollo, especialmente durante la dominancia, mientras que en folículos atrésicos su expresión disminuye. El gen de VEGF, por corte y empalme, produce 12 distintas isoformas, de ellas, VEGF120 y VEGF164 son las más abundantes. VEGF actúa a través de dos receptores: VEGF-R1 y VEGF-R2, y por corte y empalme, pueden producir formas solubles: sVEGF-R1 y sVEGF-R2. Existe poca información sobre la participación de las gonadotropinas y hormonas esteroides en la expresión de VEGF. El objetivo del trabajo, fue demostrar que existen diferencias en la expresión de dos isoformas de VEGF y tres de sus receptores (VEGF-R1, VEGF-R2 y sVEGF-R1) entre folículos dominantes (FD) del día del estro, folículos dominantes del día 6 y folículos del día 6 en atresia temprana. Se extrajo RNA de 5 FD del día del estro; 5 del día 6 del ciclo y 5 más del día 6 cuyas vacas fueron tratadas el día 5 del ciclo con líquido folicular libre de esteroides (LF). La expresión de RNAm de VEGF-120, VEGF164, VEGF-R1, VEGF-R2, sVEGF-R1 fue cuantificada por PCR-Tiempo Real. La expresión de VEGF-120 no mostró diferencias entre tratamientos, mientras que la mayor expresión de RNAm de VEGF-164 se encontró en los FD obtenidos de animales tratados con LF. En cuanto a los receptores, llama la atención que la menor expresión de ambos receptores de membrana y la mayor expresión del RNAm de sVEGF-R1.

Palabras clave: *VEGF, receptores de VEGF, folículo dominante, bovino, líquido folicular.*

ABSTRACT

The Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), is one of the most active factors in the production of new blood vessels on the mammalian ovary. The expression has been identified in granulosa cells and theca cells of follicles in different stages of development, specially during dominance, whereas in the atretic follicles, the expression diminishes. The VEGF gene, for splicing alternative produces 12 different isoforms, of them, VEGF-120 and VEGF-164 are the most abundant. VEGF acts through two receptors: VEGF-R1 and VEGF-R2, for splicing alternative they can produce soluble forms: sVEGF-R1 and sVEGF-R2.

There is little information on the involvement of gonadotropins and steroid hormones in the expression of VEGF. The aim of this work was to demonstrate that there are differences in the expression of two isoforms of VEGF and three of its receptors (VEGF-R1, VEGF-R2 and sVEGF) between dominant follicles (DF) on the day of estrus, dominant follicles of the day 6 and dominant follicles of the day 6 in early atresia. RNA was extracted from 5 DF estrus day, 5 DF of the day cycle 6 and 5 DF over 6 days which cows were treated on day 5 of the cycle with steroid-free follicular fluid (FF). The RNA expression of VEGF-120, VEGF-164, VEGF-R1, VEGF-R2, sVEGF-R1 was quantified by Real-Time PCR. The expression of VEGF-120 showed no difference between treatments, while increased expression of VEGF-164 mRNA was found in the DF obtained from animals treated with FF. As for the receptors, it is noteworthy that the lower expression of both membrane receptors and increased expression of mRNA sVEGF-R1 occurred in the DF of the day of estrus.

Keywords: *VEGF, VEGF receptors, dominant follicle, cow, follicular fluid.*

I. INTRODUCCIÓN

El desarrollo folicular comprende el crecimiento de un grupo de folículos. McGee y Hsueh (2000) denominan a este proceso reclutamiento cíclico, en él, los folículos comienzan a crecer y escapan de la atresia debido a los incrementos de la hormona folículo estimulante (FSH), para alcanzar el estado final de desarrollo folicular (Fortune, 1994) que permita su ovulación (Bao y Garverick, 1998). Es decir, la elevación de FSH es la causante que permite a los folículos crecer (Lucy *et al.*, 1992; Fortune, 1994). Lo que indica que el crecimiento folicular depende de FSH. Posteriormente de que FSH ayuda a crecer al grupo de folículos, sus niveles decaen en el momento de la selección (Ginther *et al.*, 2001b).

De acuerdo a Adams (1999) la selección es un proceso donde se elige al futuro folículo dominante y el resto serán folículos subordinados, lo que coincide con la disminución de FSH. Esta disminución de FSH, obedece a la retroalimentación negativa que ejerce la inhibina contenida en el líquido folicular del folículo dominante sobre la liberación hipofisiaria de FSH (Lee *et al.*, 1993; García *et al.*, 2001; Hernández *et al.*, 2004).

En un estudio realizado por Bleach *et al.* (2001) se aplicó a un grupo de novillas líquido folicular libre de esteroides y se encontró que los niveles de FSH eran suprimidos y el crecimiento de los folículos se detenía durante el periodo de tratamiento. Por lo que la inhibina es la hormona responsable de que se inhiba FSH, así como el crecimiento folicular.

Se ha observado que la angiogénesis, que consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos, juega un papel fundamental. Durante el desarrollo folicular, los folículos seleccionados se caracterizan por poseer una red microvascular más abundante que los que no son elegidos (Ferrara *et al.*, 2003). El aumento en la vascularidad de los folículos proporciona mejor suministro de nutrientes, factores de crecimiento, gonadotropinas, precursores esteroides, etc., necesarios para el desarrollo del folículo dominante, por lo que es clara la

importancia que tiene la vascularidad para el buen desarrollo del folículo dominante (Zimmerman *et al.*, 2001).

Durante el desarrollo folicular se ha encontrado un factor de vascularidad que ayuda al crecimiento de los folículos. Kooset *al.* (1995) menciona que el Factor de Crecimiento Endotelio Vascular (VEGF) es capaz de inducir la angiogénesis requerida para el desarrollo folicular. VEGF se ha detectado en las células de la granulosa y de la teca de los folículos, mientras que en los folículos atrésicos su expresión es reducida (Shimizu *et al.*, 2007a). Con dichas evidencias, se ha propuesto que VEGF es el agente responsable de que los folículos comiencen su desarrollo.

Para que VEGF cumpla con la función de vascularización debe estar unido a sus receptores. Los receptores de VEGF son VEGF-R1 (Flt-1) y VEGF-R2 (Flk-1) (Shimizu *et al.*, 2007a) y recientemente se ha descubierto una forma soluble del receptor VEGF-R1 (sVEGF-R1)(Hornig y Weich, 1999). Se demostró la expresión de RNAm de los receptores de VEGF en cerdos (Kaczmarek *et al.*, 2007), bovinos (Berisha *et al.*, 2000a), ovinos (Redmer *et al.*, 1996), humanos (Sugino *et al.*, 2000) y ratas (Phillips *et al.*, 1990), se ha localizado en células de la teca (Wulff *et al.*, 2001) y células de la granulosa (Greenaway *et al.*, 2004). Mientras que sVEGF-R1 es expresado por las células endoteliales (Hornig y Weich, 1999).

La expresión de VEGF se relaciona con los niveles de la gonadotropina FSH. En un estudio realizado por Shimizu *et al.* (2007), mencionan que FSH estimula la expresión de VEGF (VEGF120 y VEGF164) en bovinos. VEGF también puede asociarse con la caracterización del folículo dominante durante el desarrollo folicular del bovino relacionado con FSH (Zimmerman *et al.*, 2001). De acuerdo a lo anterior, nos propusimos demostrar que la aplicación de líquido folicular libre de esteroides, produce la disminución en la expresión del Factor de Crecimiento Endotelio Vascular (VEGF) y sus receptores (VEGF-R1, VEGF-R2 y sVEGF-R1) en folículos dominantes de bovino.

II. ANTECEDENTES

A. DESARROLLO FOLICULAR

i. Reclutamiento Inicial

Los ovarios de la gran mayoría de las hembras de los animales domésticos, poseen al nacimiento una gran reserva de folículos primordiales que no están en crecimiento, los cuales se forman durante la vida fetal (McGee y Hsueh, 2000). Un folículo primordial consiste en una célula germinal inmadura, quiescente llamada ovocito, rodeado de una sola capa de células de la pregranulosa (McGee y Hsueh, 2000). La transición entre folículos que no están en crecimiento y los que sí lo están es un proceso gradual, el cual comienza poco después de la formación del folículo primordial y continúa durante la vida reproductiva (Fortune *et al.* 1998). Los folículos primordiales constituyen la reserva ovárica, de los cuales en su momento algunos serán reclutados para comenzar su desarrollo, proceso al cual se le conoce como reclutamiento inicial. En la vaca, la formación de los folículos primordiales ocurre aproximadamente en el día 140 de la gestación (Rüsse, 1983). El reclutamiento inicial de los folículos comienza inmediatamente después de su inserción y continúa ininterrumpidamente hasta su desaparición del ovario, el primer folículo antral en la vaca puede ser identificado alrededor del día 230 de vida gestacional (Rüsse, 1983).

La activación de los folículos primordiales para entrar al reclutamiento inicial y comenzar su crecimiento, requiere de eventos orquestados entre ovocito y folículo. El folículo requiere la presencia del ligando Kit, también llamado Stem Cell Factor (SCF) producido por las células de la granulosa, mientras que su receptor (c-kit), es expresado en el ovocito, células estromales y células de la teca (Parrott y Skinner 1999; Nilsson y Skinner 2001). La inhibición de la interacción entre c-kit y SCF evita la transformación de los folículos primordiales a primarios sin bloquear la formación de los folículos primordiales. La activación del sistema de tirosina cinasa de c-kit por SCF es un factor importante en el crecimiento de los folículos primordiales (McNatty *et al.*, 1999).

De acuerdo con Braw-Tal (2002), la activación del crecimiento folicular, puede ser subdividido en dos fases distintas. En la primera fase, las células de la pre-granulosa que tenían forma plana, se transforman a granulosa con forma cuboidal. La segunda fase del crecimiento es dominada por la proliferación de las células de la granulosa y el crecimiento del ovocito (Braw-Tal, 2002).

Según algunos investigadores (Picton *et al.*, 1998; Fortune, 2003), la regulación del crecimiento del folículo durante la primera fase, se basa en un delicado balance entre señales inhibitorias y estimuladoras producidas localmente. Cuando se activan estas señales aun no conocidas, múltiples folículos primordiales inician el crecimiento. En la segunda fase, el folículo activado comienza a funcionar como una unidad autónoma, distribuyendo sus estímulos para que el ovocito en crecimiento produzca el Factor de Crecimiento de Diferenciación 9 (GDF-9) y la proteína morfogénica del hueso 15 (BMP-15) y las células de la granulosa secretan el ligando de Kit (Braw-Tal 2002).

GDF-9 también ha sido relacionado con el crecimiento temprano de los folículos, es una proteína homodimérica de la familia del Factor de Crecimiento Transformante- β (TGF- β)/activita (McGee y Hsueh, 2000). El mensaje de GDF-9 puede ser detectado tempranamente en los folículos primordiales en el ovino y bovino. En ratones mutantes, la interrupción del gen de GDF-9 previene el desarrollo de los folículos más allá del estado primario asociado con la ausencia de células de la teca y eventualmente muerte del ovocito (McGee y Hsueh, 2000).

TGF- β es conocido por ser producido en las células de la teca de bovino y puede influir en la proliferación de las células de la granulosa (McNatty *et al.*, 1999). La expresión de RNAm de TGF- β se ha descrito ampliamente en el ovario, observado en ovocitos, especialmente en folículos primordiales y es mayor en las células de la granulosa de los folículos primarios. Las células de la granulosa en cultivo también expresan el Factor de Crecimiento de Fibroblastos 2 (FGF-2), su distribución en el ovario bovino se ubica en los ovocitos de folículos primordiales, primarios, en células de la granulosa y de la teca interna de los folículos preantrales y antrales grandes. En folículos

primordiales y primarios de hamsters y cerdos se ha localizado el Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) (McNatty *et al.*, 1999).

El Factor de Crecimiento parecido a la Insulina-I (IGF-I) ha demostrado que estimula la síntesis de DNA y la actividad aromatasas en las células de la pregranulosa, y en estados de desarrollo avanzado amplifica la acción de las gonadotropinas. IGF-II estimula la mitosis en las células de la granulosa y su acción puede ser potenciada por IGF-I. Mientras que el Factor de Crecimiento de Plaquetas, modifica las vías de AMPc que responden a FSH, la diferenciación de las células de la granulosa y actúa sobre la producción de prostaglandinas (McGee y Hsueh, 2000).

La expresión del gen de FSH en bovino ha sido descrita hasta que el folículo es primario o preantral pequeño. Aunque FSH ha mostrado tener efectos estimulatorios en la proliferación y función de las células de la granulosa, no ha mostrado ser esencial. Lo que indica que esta etapa del crecimiento folicular está más influenciado por factores paracrinos o autocrinos que por factores endócrinos (McNatty *et al.*, 1999).

Durante la formación de los folículos primordiales, los ovocitos son arrestados en la profase de la primera división meiótica y por lo tanto son infértiles. La capacidad fertilizante y el reinicio de la meiosis, son procesos que ocurrirán lentamente a lo largo del desarrollo de los folículos, en general comienza con la activación del folículo y culmina en la ovulación (Suikkari y Soderstrom-Anttila, 2007).

Se conoce que los ovocitos que están en crecimiento, se localizan consistentemente en la interfase cortico-medular del ovario, la cual es una región densamente vascularizada, lo cual quiere decir que la iniciación y crecimiento de los folículos primordiales es dependiente del aporte sanguíneo y con ello del suministro de hormonas, mediadores y nutrientes (McNatty *et al.* 1999). Al respecto, un estudio reciente en roedores ha demostrado la presencia, en folículos primordiales y primarios del RNAm del Factor de

Crecimiento Endotelio Vascular (VEGF), factor de crecimiento involucrado en el desarrollo y proliferación de vasos sanguíneos (Roberts *et al.*, 2007).

Crecimiento folicular

La foliculogénesis es definida como la formación de un folículo De Graaf (maduro y preovulatorio), a partir de un grupo de folículos primordiales (sin desarrollo) (Trousdale *et al.*, 2007). El número de folículos primordiales que posee la vaca en promedio es de 133 000 folículos desde el nacimiento hasta el cuarto año de vida, pero el número de ellos declina aproximadamente hasta 3000 los cuales permanecen en los ovarios de las vacas de 15 a 20 años de edad (Spicer y Echtenkamp, 1986).

Los folículos en el bovino se han clasificado de acuerdo al número de capas de células de la granulosa tal y como lo describe McNatty *et al.* (1999) en el cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación de los estados tempranos de crecimiento folicular.

	Nombre	Células de la granulosa
1	Folículo primordial	1 capa de células aplanadas de pregranulosa.
1a	Folículo transitorio	1 capa de células cuboidales de la granulosa.
2	Folículos primarios	1 ó 2 capas de células de la granulosa.
3	Folículos preantrales pequeños	2-4 capas de células de la granulosa.
4	Folículos preantrales grandes	4-6 capas de células de la granulosa.
5	Pequeños folículos	Más de 5 capas de células de la granulosa, así

	antrales	como células de la teca.
--	----------	--------------------------

McNatty *et al.*, 1999.

Los folículos preantrales y antrales se incrementan alrededor del día 70 de edad. El número de folículos preantrales en crecimiento permanece constante (200 a 250 por par de ovarios) en vacas hasta los 4 años de edad (Spicer y Echternkamp, 1986). De esa manera, la cantidad de folículos antrales en los ovarios de las vacas se mantienen si cambios hasta que alcanza los 8 a 10 años de edad, después de eso, comienza el agotamiento de los folículos primordiales, y disminuye el número de folículos antrales (Burns *et al.*, 2005). El crecimiento de folículos antrales de 2-4 mm de diámetro en las vacas es independiente de gonadotropinas, de esa manera pueden crecer hasta ese tamaño en ausencia o en la presencia de muy bajas cantidades de gonadotropinas (Webb *et al.*, 1999).

El crecimiento final y maduración del folículo dominante depende del incremento en la frecuencia de pulsos de LH para actuar sobre: 1) células de la teca para proveer el sustrato androgénico para aromatizar a estradiol por las células de la granulosa; y 2) las células de la granulosa estimuladas por FSH para incrementar la actividad de aromatasa cuando las concentraciones de FSH declinan con el incremento del tamaño del folículo dominante (Bao y Garverick, 1998).

Debido a que las células de la granulosa contienen receptores para FSH (FSHr) y las células de la teca contienen receptores para LH (LHr) durante estados tempranos del desarrollo, ambos tipos celulares poseen la enzima P450_{scc} que es necesaria para la conversión de colesterol a pregnenolona (Bao y Garverick, 1998). Al unirse la LH a su receptor en la teca se estimula la actividad de la enzima citocromo P450 17 α -hidroxilasa (P450_{c17}) necesaria para la conversión de progesterona a androstenediona. Los andrógenos son metabolizados a estradiol por la enzima P450 aromatasa (P450_{arom}) que está

presente en las células de la granulosa (Bao y Garverick, 1998; Hampton *et al.*, 2004).

Las gonadotropinas (FSH y LH) y el estradiol se involucran en la proliferación, sobrevivencia y diferenciación de las células de la granulosa y teca durante el desarrollo de folículos dominantes (Mihm *et al.*, 2006). Para que la secreción de LH se incremente deben existir receptores para dicha hormona, por lo que hormonas como FSH y estradiol se encargan de inducir la síntesis de receptores para LH en la membrana de las células de la granulosa durante los últimos estados de desarrollo folicular (Bao y Garverick, 1998). Los folículos que están expuestos a una alta frecuencia de pulsos de LH, adquieran la capacidad para secretar cantidades altas de estradiol (Webb *et al.*, 1999; Stegner *et al.*, 2004).

Sistema IGF

El sistema del Factor de Crecimiento parecido a la Insulina, ocupa una posición central en la red de señales intraováricas. El sistema incluye a los ligandos de IGF (como IGF-I e IGF-II), al menos seis proteínas de unión de IGF (IGFBP-1 a la IGFBP-6) y las proteasas que rompen la unión entre las proteínas unidoras y los ligandos (Webb *et al.*, 1999). Este sistema tiene un papel fundamental en el mecanismo de selección del folículo dominante (Hendriksen *et al.*, 2003). IGF tipo II tiene efectos parecidos a IGF-I en las células ováricas pero tiene una potencia menor que IGF-I y no es controlado por hormona de crecimiento (HG) (Lucy *et al.*, 1999).

IGF tiene la función de modular la acción de las gonadotropinas a nivel celular y estimula la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa y teca (Armstrong y Webb, 1997). Las células de la granulosa, células de la teca y lúteas tienen sitios de acción para IGF. Dentro de los folículos de bovino, IGF es producida en la teca y de manera más importante en las células de la granulosa. Además, IGF-I incrementa en respuesta a las gonadotropinas por estimular el complejo adenilato ciclasa (Lucy *et al.*, 1999).

La bioactividad de IGF es controlada por su asociación con la familia de proteínas ligadoras de IGF (IGFBPs), seis distintas IGFBPs han sido caracterizadas, la expresión de esas proteínas es específica por especies, por ejemplo, en vacas y ovejas la expresión de RNAm que codifica IGFBP-4 y -2 es restringida a la teca y granulosa (Armstrong y Webb, 1997). Entonces, la bioactividad de IGF es controlada por 3 mecanismos: 1) cambios en la expresión temporal y espacial de RNAm que codifica IGFBP durante la foliologénesis; 2) regulación del enlace de IGFBP a la matriz extracelular y la membrana plasmática; y 3) la acción de proteasas específicas de IGFBP. El papel preciso de las proteínas ligadoras en el desarrollo del folículo permanece incierto (Armstrong y Webb, 1997).

Desarrollo vascular de los folículos ováricos

El suministro vascular es esencial para el desarrollo y función de los órganos (Ferrara, 2001). La angiogénesis comienza con proliferación y migración de las células endoteliales lo que conduce a la vascularización de tejidos, crecimiento y remodelación de los capilares para formar una nueva microcirculación (Shimizu *et al.*, 2003a; Redmer y Reynolds, 1996). Robinson y Stringer (2001) y Barboni *et al.* (2000) definen la angiogénesis como el proceso en el que se forman nuevos vasos a partir de la vasculatura preexistente. Ferrara *et al.* (1992), mencionan que la angiogénesis es una cascada de procesos que consiste en: 1) degradación de la matriz extracelular después de la descarga de proteasas; 2) proliferación de células endoteliales de los capilares; y 3) migración de los túbulos capilares hacia el estímulo angiogénico.

Los órganos reproductivos de la hembra exhiben procesos de crecimiento y regresión extremadamente rápidos (Redmer y Reynolds, 1996). El crecimiento y regresión de los tejidos reproductivos está acompañado por cambios importantes en su vasculatura, que implica una tasa de mitosis alta de las células del endotelio vascular. De esta manera, tejidos como el ovario, útero y

placenta son altamente vasculares y reciben una gran tasa de flujo sanguíneo (Reynolds y Redmer, 1998).

En los ovarios, cada ciclo hormonal está acompañado por cambios vasculares (Shimizu *et al.*, 2003a). De modo que la angiogénesis se presenta a lo largo del crecimiento folicular (Wulff *et al.* 2001) por lo que el crecimiento folicular y el desarrollo del cuerpo lúteo dependen de la proliferación de nuevos vasos sanguíneos (Ferrara *et al.*, 2003).

Los folículos desde primordiales hasta preantrales no tienen un suministro vascular propio, por lo que dependen para el aporte de nutrientes y otros sustratos, totalmente de la irrigación de la médula ovárica. Los vasos estromales son los encargados de proporcionar los nutrientes y oxígeno suficientes a los folículos primordiales (Robinson *et al.*, 2009), debido a que éstos folículos son avasculares, mientras que los folículos secundarios poseen una red vascular confinada sólo en las células de la teca (Zimmerman *et al.*, 2001).

La densidad de vasos sanguíneos se incrementa considerablemente en los folículos desde preantrales y durante el desarrollo folicular en cerdos (Robinson *et al.*, 2009). En el caso de los folículos antrales, la red vascular se limita a las células de la teca sin penetrar la membrana basamental (Wulff *et al.*, 2001), dicha red vascular consiste en dos redes capilares, una próxima a la membrana basamental y la otra en la teca externa (Shimizu *et al.*, 2003b; Robinson *et al.*, 2009).

El proceso de selección del folículo dominante ha sido asociado con la angiogénesis, debido a que los folículos seleccionados poseen una elaborada red microvascular (Ferrara *et al.*, 2003; Berisha *et al.*, 2000a; Shimizu *et al.*, 2002). Los folículos seleccionados poseen una vascularidad que se incrementa aún más en las células de la teca (Zimmerman *et al.*, 2001).

Los folículos dominantes no solo son más vascularizados, sino que reciben un soporte hormonal mayor, por lo que se ha sugerido que el incremento vascular puede determinar la dominancia folicular (Reynolds y Redmer, 1998), del

mismo modo, Wulff *et al.* (2001) y Shimizu *et al.* (2003a) mencionan que el incremento vascular de los folículos resulta en un reparto preferencial de gonadotropinas, así como elementos indispensables para su desarrollo como factores de crecimiento, precursores esteroides y otras sustancias necesarias, que determinan la dominancia del folículo (Greenaway *et al.*, 2004).

La vasculatura folicular se ha relacionado con el mantenimiento de la salud del folículo. Por ejemplo, folículos atrésicos de ovino regeneran al colocarse en cultivos, lo que sugiere que su estado atrésico probablemente se deba al menor aporte de nutrientes ocasionado por una menor irrigación.

La disminución de la proliferación de las células endoteliales en la teca se asocia con una reducida vascularidad, lo cual se considera un evento temprano durante la atresia folicular (Reynolds y Redmer, 1998), sugiriendo que el folículo permanece en estado atrésico porque una vascularidad menor limita el acceso de nutrientes. El desarrollo vascular de los folículos ováricos se vuelve más intenso después de la ovulación, lo cual favorece el desarrollo del cuerpo lúteo (Reynolds y Redmer, 1998).

Entre la oleada de LH y el desarrollo temprano del cuerpo lúteo, se produce una extensiva formación vascular y diferenciación celular (luteinización) (Acosta *et al.*, 2003), posteriormente, una rápida angiogénesis se lleva a cabo para la maduración del cuerpo lúteo teniendo un elevado flujo sanguíneo (Greenaway *et al.*, 2004), lo que entre otras cosas proporciona lipoproteínas de baja densidad para la biosíntesis de esteroides y habilita el transporte de los esteroides secretados (Neulen *et al.*, 1998), que se acompaña de la salida de colesterol de las células lúteas para la biosíntesis de progesterona (Ferrara *et al.*, 2003).

Los principales factores angiogénicos incluyen al factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el sistema de angiopietinas (ANGPT) y principalmente el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular(VEGF). En el cuadro 2 se presentan los principales

factores angiogénicos y algunas de sus características (Robinson *et al.*, 2009).

Cuadro 2. Principales factores angiogénicos.

Ligando	Isoforma	Receptor	Funciones
VEGF-A	VEGF-121 VEGF-145 VEGF-165 VEGF-189 VEGF-206	VEGF-R1. VEGF-R2.	Estimula proliferación endotelial, migración y permeabilidad vascular.
FGF2		FGFR1-4	Mitógeno para fibroblastos.
PDGF	PDGFA PDGFB PDGFC PDGFD	PDGFRA (PDGFAA, AB,BB) PDGFRB (PDGFBB).	Activación de PDGFRB por PDGFBB estimulando el reclutamiento de pericitos.
ANGPT	ANGPT1 ANGPT2	Tie2 ANGPT1 activa Tie2. ANGPT2 es un antagonista endógeno.	ANGPT1 estimula la maduración de vasos mientras que ANGPT2 desestabiliza el contacto endotelio-pericito.

Robinson *et al.*, 2009.

Ferrara *et al.* (2003) y Greenaway *et al.* (2005) menciona que VEGF induce la angiogénesis requerida para el desarrollo folicular, crecimiento y viabilidad. VEGF es producido en las células de la teca y de la granulosa en el ovario

(Roberts *et al.*, 2007). Se ha mostrado que la producción de VEGF es dependiente de gonadotropinas y está relacionado con el tamaño folicular (Mattioli *et al.*, 2001; Danforth *et al.* 2003). Pruebas como RT-PCR y ELISA revelan que los ovarios expresan VEGF en las células de la granulosa de los folículos y la proteína de VEGF se incrementa en el líquido folicular (Shimizu *et al.*, 2003b).

Fisiológicamente, se ha sugerido que VEGF inicia el crecimiento vascular y el mantenimiento del soporte vascular del cuerpo lúteo (Neulen *et al.*, 1998). Berisha *et al.* (2000a) demostraron la expresión de VEGF y sus receptores (VEGF-R1 y VEGF-R2) en las células de la granulosa de folículos preovulatorios.

La presencia de RNAm de VEGF ha sido demostrada en folículos primordiales, primarios, secundarios y terciarios (Wulff *et al.*, 2001), seleccionados y atrésicos (Taylor *et al.*, 2007), así como en folículos dominantes de marmoseta (Grazul-Bilska *et al.*, 2007); en bovinos, en cuerpo lúteo (Berisha *et al.*, 2000b; Hünigen *et al.*, 2008) y en células de la granulosa (Kosaka *et al.*, 2007; Doyle *et al.*, 2009); en ovinos en cuerpo lúteo (Redmer *et al.*, 1996), en cerdas en folículos antrales (Mattioli *et al.*, 2001; Shimizu *et al.*, 2002) y atrésicos (Mattioli *et al.*, 2001), así como en células de la granulosa y de la teca en cultivo (Barboni *et al.*, 2000); en la cerda, en el cuerpo lúteo (Kaczmarek *et al.*, 2009); en la rata, la expresión ha sido detectada en folículos preantrales, antrales y preovulatorios (Shimizu *et al.*, 2007b); en el búfalo de agua en cuerpo lúteo (Papa *et al.*, 2007) y en el humano en células de la granulosa (Neulen *et al.*, 1998) y en el líquido folicular (Kawano *et al.*, 2003).

La proteína ha sido identificada en folículos terciarios, dominantes (Taylor *et al.*, 2004), preovulatorios (Christenson y Stouffer, 1997) y atrésicos (Taylor *et al.*, 2004) de primates; en folículos primordiales de ratón (Roberts *et al.*, 2007); en folículos primarios, secundarios (Danforth *et al.*, 2003) y antrales (Phillips *et al.*, 1990; Quintana *et al.*, 2004) de rata, y en el humano se ha encontrado en cuerpo lúteo (Kamat *et al.*, 1995; Wulff *et al.*, 2001).

Factor de Crecimiento Endotelio Vascular

El factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF), también llamado VEGF-A, es un agente mitógeno y de permeabilidad (Houck *et al.*, 1991; Leung *et al.*, 1992) capaz de estimular angiogénesis, asociado con el rápido crecimiento vascular en condiciones fisiológicas y patológicas. Pertenece a la superfamilia de factores de crecimiento ligadores de cisteína, caracterizados por ocho residuos conservados de cisteína (Hazzard *et al.* 1999). VEGF induce proliferación de células endoteliales y promueve la migración celular (Wang *et al.*, 2002).

VEGF es una glicoproteína secretada en forma de homodímeros de 45 kda, de carácter básico y ligada a heparina (Robinson y Stringer, 2001), también se conocen otros integrantes de esta familia, como VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, y Factor de Crecimiento Placenta (como PlGF-1 y PlGF-2) (Ng *et al.*, 2006). De VEGF-B existen dos variantes con 167 y 188 residuos, y puede formar heterodímeros con VEGF165. Los otros miembros de VEGF (-C y -D), son moléculas procesadas proteolíticamente involucradas en la formación del endotelio linfático. VEGF-E ha sido descrito como una forma viral de VEGF encontrada en aislados de parapox virus (Horning y Weich, 1999).

El gen VEGF-A codifica para 8 exones y 7 intrones (Ferrara y Davis, 1997; Horning y Weich, 1999; Robinson y Stringer, 2001). Todas las isoformas de VEGF-A poseen los exones 1 a 5 y 8, mientras que la presencia o ausencia de los exones 6a, 6b y 7, determina cada una de las variantes así como las características de cada una de las isoformas (Zygalaki *et al.*, 2005); esto es debido al procesamiento alternativo de los exones 6a, 6b y 7 durante el proceso de corte y empalme (*splicing*) de intrones.

La isoforma VEGF-206 posee los ocho exones, la isoforma VEGF-189 carece del exón 6b, la isoforma VEGF-165 carece de los exones 6a y 6b, mientras que la isoforma VEGF-120 no posee los exones 6a y 6b ni el exón 7 (Robinson y

Stringer, 2001). Los exones 3 y 4 contienen los sitios de unión para los receptores VEGF-R1 y VEGF-R2, respectivamente (Ng *et al.*, 2006).

En los ovarios de los mamíferos se ha demostrado la expresión de las isoformas VEGF-120 y VEGF-164, las cuales están relacionadas con la angiogénesis durante el desarrollo folicular (Shimizu *et al.*, 2007a), además una débil expresión de VEGF-189 también se ha detectado en ovarios de bovino (Berisha *et al.*, 2000b; Greenaway *et al.*, 2004). Cada una de las isoformas posee características particulares, VEGF-121 es un polipéptido débilmente ácido y no se liga a la heparina (Ferrara y Davis, 1997; Robinson y Stringer, 2001). No enlaza a los proteoglicanos heparan sulfato (HSPGs) y es altamente difusible. VEGF-165 es la isoforma más abundante, tiene afinidad moderada por heparan sulfatos y es parcialmente secuestrada en la superficie celular y en la matriz extracelular. La unión de VEGF-165 con la heparina es una propiedad conferida por los 15 residuos básicos codificados por el exón 7, que es definido como el dominio de enlace a heparina (Ferrara, 1999; Ng *et al.*, 2006).

VEGF-189 tiene una alta afinidad por los HSPGs debido a la presencia de residuos básicos adicionales dentro de un segundo dominio de enlace a heparina, codificado por el exón 6. Como resultado, VEGF-189 está asociada a la superficie celular y a la matriz extracelular (Ng *et al.*, 2006). Las isoformas VEGF-189 y VEGF-206 son más básicas y se ligan a la heparina con gran afinidad (Ferrara y Davis, 1997).

En cuanto a la regulación en la expresión genética de VEGF, la hipoxia juega un papel importante en la estimulación de su expresión (Ferrara y Davis, 1997). Citocinas como el Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF-4), el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), el Factor de Necrosis Tumoral (TNF), el Factor de Crecimiento Transformante (TGF), Factor de Crecimiento de Queratinocitos (KGF), Interleucina 1 (IL-1) e IL-6, así como las gonadotropinas son capaces de regular la angiogénesis al controlar la expresión de VEGF (Neufeld *et al.*, 1999).

Recientemente, se ha demostrado que el exón 8 da origen a dos sub-exones, 8a y 8b, este exón está conformado por dos sitios, el sitio de corte (*splicing*) proximal (PSS) que dará origen a las isoformas angiogénicas (VEGF_{xxx}a), y el sitio de corte distal (DSS) que dará origen a las isoformas anti-angiogénicas (VEGF_{xxx}b) siendo xxx el número de aminoácidos de la proteína de cada isoforma. El corte del exón 8 produce una familia alterna de isoformas como VEGF-121b, VEGF-165b, VEGF-145b y VEGF-189b (Nowak *et al.*, 2008; Harper y Bates, 2008), ver Figura 1.

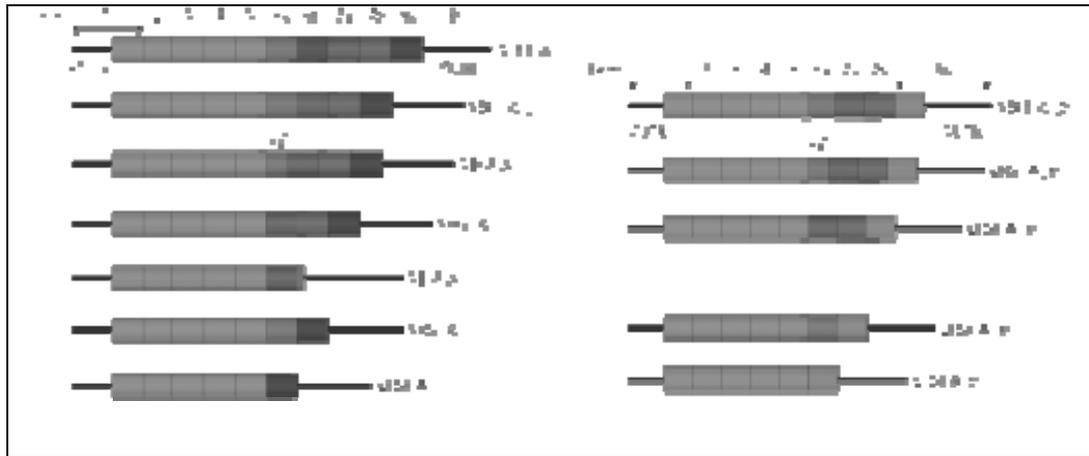


Figura 1. Isoformas Angiogénicas y antiangiogénicas del Factor de Crecimiento Endotelio Vascular. Tomado de Harper y Bates (2008).

La primera isoforma anti-angiogénica de VEGF descrita fue VEGF165b, en la cual se observó que no parecía estimular la proliferación o migración de las células endoteliales. Posteriormente se descubrió que estaba conformada por una variante en el sitio de corte distal del exón 8, que posee un marco de lectura abierto codificado por la secuencia alterna del exón 8, pero con el mismo número de aminoácidos que la proteína madura (Woolard *et al.*, 2004).

Receptores de VEGF

Las acciones de los miembros de la familia de VEGF son mediados por la activación de receptores tirosina cinasa los cuales son VEGF-R1 (Flt-1) y VEGF-R2 (Flk-1/KDR) (Clauss *et al.*, 1996) que son casi exclusivamente

expresados en células endoteliales y VEGF-R3 (Flt-4) cuya expresión está limitada principalmente al endotelio linfático (Neagoe *et al.*, 2005).

VEGF-R1 es un receptor transmembranal de la familia de receptores tirosina cinasa (De Vries *et al.*, 1992). La glicoproteína de VEGF-R1 tiene un peso de 180-KDa y posee una alta afinidad por VEGF con una Kd de 10-30 pM (Berisha *et al.*, 2000a). En las células endoteliales, VEGF-R1 es mediador de la proliferación, quimiotáxis y sobrevivencia celular (Greenaway *et al.*, 2004). VEGF-R2 es un receptor de 200-230 KDa de alta afinidad para VEGF-A, así como por VEGF-C y VEGF-D (Robinson y Stringer, 2001) y posee una Kd de 75-125 pM (Ferrara, 1999). Se ha observado la importancia de VEGF-R2 en experimentos realizados con ratas por Voelkel y Tuder (2000) donde la inhibición de dicho receptor causó muscularización de las arteriolas, hipertensión pulmonar severa, irreversible y fatal.

Algunos autores sugieren que la función del VEGF-R1 es la de atraer a VEGF, reduciendo de ese modo el número de moléculas de VEGF disponibles para unirse a VEGF-R2. Aunque VEGF-R2 se une a VEGF con una afinidad menor que VEGF-R1, este receptor es considerado como el mayor mediador de los efectos mitogénicos, angiogénicos y de permeabilidad vascular de VEGF (Kaczmarek *et al.*, 2009).

Ambos receptores contienen siete dominios extracelulares, parecidos a los de las inmunoglobulinas (Neufeld *et al.*, 1999), una región transmembranal, y una secuencia intracelular conservada de tirosina cinasa interrumpida por un dominio de inserción de cinasa (Ng *et al.*, 2006). Ferrara (2001) menciona que VEGF se une al segundo dominio parecido a inmunoglobulina de VEGF-R1 y de VEGF-R2. El segundo y el tercer dominio en ambos receptores parecen ser necesarios para enlaces de alta afinidad (Robinson y Stringer, 2001). El cuarto dominio está relacionado con la dimerización en ambos receptores (VEGF-R1 y VEGF-R2). El quinto y sexto dominio de VEGF-R2 parecen ser requeridos

para retener al VEGF después de enlazarlo, mientras el primer dominio regula el enlace, mejorando la asociación con VEGF (Robinson y Stringer, 2001).

La dimerización de los receptores conduce a su activación y subsecuente fosforilación en ciertos residuos de tirosina, que disparan la cascada de señales intracelulares mediada por varios efectores, que son capaces de reconocer y utilizar como muelle para los residuos de tirosina fosforilada de los receptores activados (Kowanetz y Ferrara, 2006).

La expresión del RNAm de VEGF-R1 y VEGF-R2 ha sido demostrada en células de la granulosa de bovino en cultivo (Einspaner *et al.*, 2002), en folículos ováricos fetales de bovino (Yang y Fortune, 2007).

Una variante alternativa del pre-RNAm que codifica para VEGF-R1 resulta en la producción de la forma soluble que abarca el dominio ligando-unión de ese receptor (sVEGF-R1), la cual es un potente antagonista de VEGF (Yulong *et al.*, 1999; Cui *et al.*, 2003). El receptor soluble sVEGF-R1 carece de la región transmembranal e intracelular, sólo contiene 6 dominios parecidos a inmunoglobulina que conforman la región extracelular, la cual está directamente involucrada en la interacción con los ligandos de VEGF (Horning y Weich, 1999), con una K_d de 10 a 20 pM y es capaz de inhibir la mitogénesis inducida por VEGF (Ferrara, 1999). De ese modo, la forma soluble de VEGF-R1 actúa como un inhibidor de la angiogénesis al secuestrar a VEGF (Kendall *et al.*, 1996; Kendall y Thomas, 1993) e impedir su interacción con VEGF-R1 y VEGF-R2, impidiendo de esta forma la acción biológica del ligando: mitogénesis de las células endoteliales y permeabilidad vascular (Hastings *et al.*, 2003), los receptores de VEGF se muestran en la figura 2.

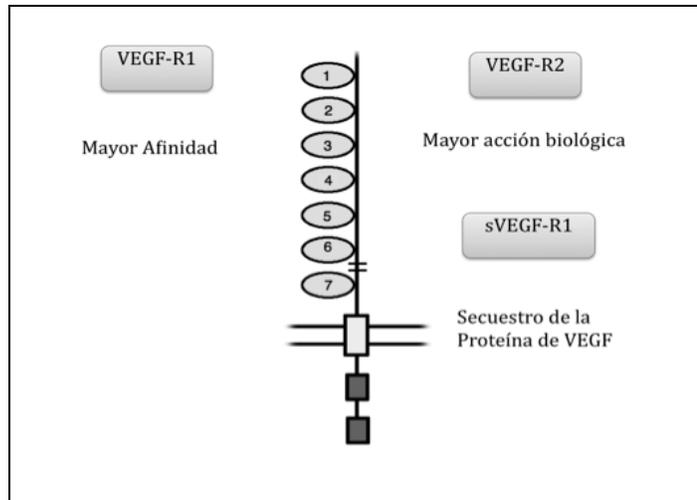


Figura 2. Receptores de VEGF. Adaptado de Robinson y Stringer (2001).

La expresión de RNAm de sVEGF-R1 ha sido descrita primeramente en células del endometrio de mujeres (Krussel *et al.*, 1999), placenta de ratón (Hastings *et al.*, 2003). Recientemente, su expresión ha sido localizada en cuerpo lúteo de cerdas (Kaczmarek *et al.*, 2009).

ii. Reclutamiento Cíclico

El reclutamiento cíclico inicia con la aparición de la pubertad, es un proceso en el cual una cohorte de folículos antrales comienzan a crecer por estímulo de gonadotropinas (Ireland *et al.*, 2000). Además, es un mecanismo que permite escapar a un pequeño porcentaje de folículos de la atresia y proceder al estado final de desarrollo folicular (Fortune, 1994) para permitir el crecimiento de los folículos hacia la ovulación (Bao y Garverick, 1998). Durante el reclutamiento cíclico ocurre un proceso denominado emergencia, que es cuando los folículos poseen un diámetro de 4-6 mm y marca el inicio de la oleada folicular (Evans, 2003; Ireland *et al.*, 2000).

Oleadas de crecimiento folicular en el bovino

Durante el ciclo estral de la vaca se han observado de dos a tres oleadas de crecimiento folicular (Taylor y Rajamahendran, 1991) en vacas *Bos Taurus*,

mientras que en vacas *Bos indicus* se han observado ocasionalmente hasta cuatro oleadas (Adams, 1999). La emergencia de la primera oleada folicular ocurre el día de la ovulación, y consiste en que un grupo de folículos pequeños de 8-41 (según Adams, 1999), en promedio 24 (según Ireland *et al.*, 2000), comienzan a crecer.

La emergencia está acompañada por un incremento transitorio en la concentración de FSH (Webb *et al.*, 1999) que ocurre 1 ó 2 días antes de emerger la oleada (Evans y Fortune, 1997; Melvin *et al.*, 1999; Ireland *et al.*, 2000). Posteriormente, los folículos de la cohorte alcanzan un crecimiento similar y de ellos uno será seleccionado para continuar su crecimiento (folículo dominante), mientras que el resto (folículos subordinados) se volverán atrésicos (Adams, 1999).

En la dinámica folicular, el primer folículo dominante sufrirá regresión y con ello dará inicio la segunda oleada folicular (reclutamiento, selección y dominancia) que resulta en la presencia de un segundo folículo dominante. La maduración del segundo folículo dominante coincide con la regresión espontánea del cuerpo lúteo, y dicho folículo ovulará después de la luteólisis, si fuese el caso de dos oleadas foliculares (Lucy *et al.*, 1992).

Las oleadas foliculares ocurren en intervalos de 7 a 8 días a lo largo del ciclo estral (Evans y Fortune, 1997). La emergencia de la primera oleada folicular ocurre el día de la ovulación (Adams, 1999). Otros autores han referido al día 2, y el día 11 para animales con dos oleadas de crecimiento folicular, ó en los días 2, 9 y 16 en animales con tres oleadas de desarrollo folicular (Ireland *et al.*, 2000; Evans, 2003). Dichas diferencias se deben a que consideran el inicio de la oleada cuando el folículo se hace visible a través de ultrasonografía. El reclutamiento, selección y dominancia por lo general han sido descritos en los días 1-3, 3-6 y 6-8 del ciclo estral (Hendriksen *et al.*, 2003).

Moléculas que participan durante el reclutamiento cíclico

Receptores a gonadotropinas: La expresión de RNAm para el receptor de la hormona folículo estimulante (FSHr) ha sido localizado en los folículos primarios con una a dos capas de células de la granulosa, posiblemente antes de la formación de la teca interna y membrana basal (Bao y Garverick, 1998). El receptor de LH (LHr) se ha localizado en las células de la teca durante el reclutamiento y crecimiento de la cohorte (Webb *et al.*, 1999).

Enzimas esteroideogénicas: Los RNAm de P450scc y P450arom se expresan en las células de la granulosa de folículos mayores de 4-6 mm de diámetro (Bao y Garverick, 1998; Webb *et al.*, 1999). La expresión de RNAm de P450scc y P450arom podría deberse al incremento de FSH en la circulación que precede al inicio de cada oleada de crecimiento folicular (Webb *et al.*, 1999).

De acuerdo con Bao y Garverick (1998), la expresión de RNAm para los receptores de gonadotropinas y enzimas esteroideogénicas indica la producción de esteroides en las células de la teca y de la granulosa durante cada estado de desarrollo folicular. Durante el reclutamiento en los folículos, que crecen de 5 a 8-9 mm de diámetro, las células de la granulosa expresan RNAm de las enzimas P450scc y P450arom, pero no expresan RNAm para 3 β -HSD y StAR (proteína que regula el transporte de colesterol hacia el interior de la membrana mitocondrial para su conversión en pregnenolona por el complejo enzimático P450scc) (Webb *et al.*, 1999).

VEGF es expresada en las células de la granulosa de los folículos secundarios y terciarios, mientras que su receptor VEGF-R1 es expresado en las células endoteliales de la capa de la teca (Wulff *et al.*, 2001). Además, en los folículos antrales de cerdo se producen cantidades sustanciales de VEGF durante la fase de crecimiento, en respuesta a estimulación por gonadotropinas (Mattioli *et al.*, 2001).

Después de la ovulación, el mecanismo que controla el reclutamiento es el incremento en la concentración de FSH en el plasma (Lucy *et al.*, 1992). Durante el reclutamiento los folículos reciben una señal que les permite continuar creciendo, dicha señal parece ser una ligera elevación plasmática de

FSH (Fortune, 1994). De acuerdo a estudios realizados por Fortune, (1994), el suprimir la segunda oleada de FSH con líquido folicular como fuente de inhibina previene el reclutamiento de una serie ovulatoria.

En un experimento realizado por Arai *et al.* (1996) se observó que la secreción de FSH se incrementaba en los animales cuando son inmunoneutralizados contra inhibina. La inhibina suprime el desarrollo folicular, a través de esta hormona se inhibe FSH a nivel hipofisiario, lo que resulta en la supresión del crecimiento folicular y la producción de estradiol (García *et al.*, 2001; Hernández *et al.*, 2004).

iii. Selección y moléculas que participan en el proceso

La selección consiste en la reducción del número de folículos que crecen en la cohorte (Ireland *et al.*, 2000) y es un proceso en el que uno o más de los folículos reclutados son seleccionados para continuar con su desarrollo (Webb *et al.*, 1999). Lucy *et al.* (1992) lo definen como el proceso en el cual un folículo es elegido y evita la atresia, por lo que se vuelve competente para alcanzar la ovulación. La selección del futuro folículo dominante ocurre al final de la fase de crecimiento común, dicho folículo crecerá de forma continua, mientras que el resto de los folículos de su cohorte sufrirán regresión (Ginther *et al.*, 2001b).

El tiempo de selección (divergencia en el crecimiento entre el folículo dominante y los folículos subordinados) coincide con la disminución significativa de FSH (Mihm *et al.*, 1997; Adams, 1999), dicha disminución se observa a las 10-20 horas del comienzo de la desviación (Ginther *et al.*, 2001b). Además, en la selección existe un cambio en la dependencia a gonadotropinas, de FSH a LH (Adams, 1999). Las células de la granulosa del folículo dominante adquieren receptores a LH justo antes de iniciar la desviación (Ginther *et al.*, 2001b) y disminuyen sus receptores a FSH en las

células de la granulosa (Mihm *et al.*, 1997), con lo cual, el folículo dominante sobrevive en un ambiente difícil para el resto de los folículos.

En el líquido del folículo dominante de bovino se ha encontrado estradiol (Beg *et al.*, 2002), IGF-I, IGFBPs, e inhibina (Parker *et al.*, 2003). El líquido folicular del folículo dominante posee una mayor cantidad de inhibina, ya que su mayor función es la de regular negativamente la secreción de FSH (Arai *et al.*, 1996).

El efecto bloqueador de la inhibina sobre la FSH, ha sido demostrado al aplicarle líquido folicular a un grupo de novillas en las cuales se inhibieron los niveles de FSH, así como el crecimiento de folículos de 5 mm de diámetro o mayores (Bleach *et al.*, 2001). Del mismo modo, Moser *et al.* (1989) observaron que con la aplicación de líquido folicular, tratado con carbón activado, durante el periodo preovulatorio, retrasó el estro en novillas, por la inhibición específica de la secreción de FSH, además de que amplió el intervalo entre estros debido a la reducción de la concentración de FSH para estimular la foliculogénesis.

El folículo con un mayor desarrollo desde el punto de vista funcional es capaz de sobrevivir en un ambiente con niveles de FSH mínimos, debido a que éste desarrolla en las células de la granulosa receptores a LH (LHr) y es capaz de responder tanto a LH como a FSH, sobreviviendo en un ambiente que es difícil para los folículos subordinados. De esa forma, se sabe que el primer folículo que adquiere receptores a LH en las células de la granulosa es seleccionado para volverse dominante porque responde a ambas gonadotropinas (FSH y LH) (Bao y Garverick, 1998). Además, el crecimiento continuo de los folículos seleccionados se relaciona con un incremento en la expresión de enzimas esteroidogénicas y StAR (Webb *et al.*, 1999).

iv. Dominancia y moléculas que participan en el proceso

El folículo dominante presenta un rápido desarrollo (Webb *et al.*, 1999) y causa regresión o atresia al resto de los folículos de su cohorte, su alta producción de estradiol e inhibina, provocan la retroalimentación negativa en la hipófisis para la liberación de FSH, que no soportan los folículos subordinados (Fortune, 1994).

Diferenciación de los folículos dominantes

El folículo seleccionado (dominante) de la última oleada folicular que coincide con la luteólisis, crecerá y se diferenciará funcionalmente de modo que se prepara para la ovulación y prepara a la hembra para la gestación. En el folículo dominante, se encuentra una alta concentración de 17β -estradiol en el líquido folicular (Fortune, 1994). Ireland y Roche (1983) observaron que folículos de menor tamaño tienen elevadas concentraciones de progesterona y andrógenos, ya que no poseen las enzimas necesarias para la síntesis de estradiol, mientras que el folículo dominante sí posee una alta concentración de 17β -estradiol y menor cantidad de progesterona y andrógenos.

La producción de estradiol por el folículo dominante es de gran importancia (Fortune, 1994) porque esta hormona promueve la expresión de receptores a LH, incrementando la sensibilidad de las células de la granulosa a FSH y LH, e incrementando la síntesis de IGF-I en las células de la granulosa (Beg *et al.*, 2002). La capacidad de secretar estradiol requiere de la acción de las células de la teca para la secreción de andrógenos y las células de la granulosa para aromatizar el andrógeno a estradiol. Por lo que las células de la teca del folículo dominante secretan más andrógenos y las células de la granulosa tienen mayor capacidad para convertir los andrógenos a estradiol (Fortune, 1994).

El incremento de la secreción pulsátil de LH se ha asociado con la extensa vida de folículos dominantes (Webb *et al.*, 1999). Stock y Fortune (1993), mencionan que el incremento en la frecuencia pulsátil de LH parece mantener la dominancia.

La expresión de RNAm para los receptores a gonadotropinas, enzimas esteroideogénicas y StAR se incrementa en las células de la teca y de la granulosa durante la fase de crecimiento, produciendo una gran cantidad de estradiol. Es decir, el folículo dominante adquiere la capacidad de producir esteroides durante su desarrollo (Webb *et al.*, 1999). Además, el folículo dominante tiene una abundante expresión de RNAm para LHr (Hampton *et al.*, 2004).

El incremento de la frecuencia de pulsos de LH incrementa la expresión de RNAm para enzimas esteroideogénicas necesarias para las síntesis de precursores androgénicos para la producción de estradiol (Webb *et al.*, 1999; Melvin *et al.*, 1999). En el folículo dominante se expresa el RNAm de enzimas esteroideogénicas como son P450_{scc}, P450_{c17} y 3 β -HSD. Los niveles de aromatasa son capaces de convertir grandes cantidades de andrógenos producidos por las células de la teca a 17 β -estradiol, de ese modo 17 β -estradiol mejora la respuesta de las células de la granulosa a FSH (Bao y Garverick, 1998).

Bao y Garverick (1998), mencionan que las células de la granulosa de los folículos dominantes expresan altos niveles de RNAm de IGF-I y las de la teca IGF-II comparados con folículos subordinados o sin reclutar. Así mismo, se han encontrado bajas concentraciones de IGFBP en folículos sanos en comparación con las grandes concentraciones presentes en los folículos atrésicos. La expresión de IGF-I ha sido reconocida por mejorar la respuesta de FSH al folículo dominante (Quirk *et al.*, 2004).

Se ha demostrado la expresión de RNAm de VEGF en las células de la granulosa en folículos dominantes, al compararlo con los folículos subordinados (Zimmerman *et al.*, 2001). Grazul-Bilska *et al.* (2007) observaron en cortes histológicos de folículos dominantes la proteína de VEGF, concluyendo que existe una estrecha relación entre la vascularidad folicular y la dominancia folicular.

La vasculatura folicular es muy importante para saber si un folículo es sano o atrésico, por ejemplo un folículo atrésico tiene una red vascular menos desarrollada, lo que puede limitar el acceso de nutrientes, hormonas tróficas y sustratos, mientras que un folículo sano tiene una red vascular más extensa (Redmer y Reynolds, 1996). En un estudio en marmosetas se observó que VEGF era un elemento determinante para el establecimiento de la dominancia, ya que con un tratamiento anti-VEGF se producía un bloqueo de la angiogénesis suprimiendo la proliferación de las células endoteliales y disminuyendo la vasculatura de las células de la teca, lo que ocasiona el fallo de la ovulación y formación de un cuerpo lúteo (Taylor *et al.*, 2007), también en mono rhesus se ha observado que la administración anti-VEGF interfiere con el desarrollo normal del folículo dominante (Zimmerman *et al.*, 2001).

v. Atresia

La palabra atresia (a=no, tresia=perforado) ha sido usualmente utilizada para describir el cierre de una apertura natural (Hsueh *et al.*, 1994); específicamente, ha sido referida a los cambios degenerativos de los folículos antrales que residen en el ovario, por este proceso se pierde hasta el 99% de los folículos presentes en los ovarios de los mamíferos (Van *et al.*, 1999). La atresia ocurre en todos los estados de desarrollo folicular aunque es más frecuente en los folículos antrales (Quirk *et al.*, 2004).

Todos los folículos que inician el crecimiento y no son seleccionados como dominantes, se vuelven subordinados y serán eliminados del ovario por el proceso de atresia (Foghi *et al.*, 1998a). Los folículos dominantes que no sean ovulados también se volverán atrésicos y serán eliminados del ovario (Hsueh *et al.*, 1994). La atresia folicular se caracteriza por la muerte de las células que conforman el folículo, comenzando por las células murales de la granulosa, las de la teca y por último el ovocito. El folículo atrésico presenta disminución en la expresión de RNAm de FSHr en las células de la granulosa, en la expresión de

RNA_m de LH_r en las células de la teca, de P450_{scc} en células de la teca y de la granulosa, y de P450_{c17} en las células de la teca, así como de las hormonas esteroideas en el líquido folicular, incluyendo las concentraciones de 17β-estradiol.

En todas las especies, la atresia folicular ha sido relacionada con la disminución de estrógenos y con el incremento de la producción de progesterona, así como una disminución de sustrato para la aromatización de las células de la granulosa y la pérdida de la actividad aromatasa (Hsueh *et al.*, 1994). Además la actividad de la P450_{arom} es mínima ó ausente en la células de la granulosa, que es precedida por la reducción de la capacidad esteroideogénica en las células de la teca (Bao y Garverick, 1998). Por lo que se ha observado que la disminución en la respuesta a gonadotropinas y producción de estrógenos son probablemente el inicio de la atresia folicular (Hsueh *et al.*, 1994).

Apoptosis en los folículos atrésicos

Durante la atresia ocurre la muerte de las células que conforman al folículo, el principal tipo de muerte que ocurre es la apoptosis, la cual se define como una secuencia de eventos intracelulares genéticamente programados que conducen a la muerte celular (Blondin *et al.*, 1996). En la apoptosis el núcleo se condensa y forma brotes, frecuentemente con un tamaño invariablemente grande de cromatina condensada. La célula se fragmenta en pedazos rodeados de membrana que se conocen como cuerpos apoptóticos, los cuales son fagocitados en principio por las células vecinas (Van *et al.*, 1999; Flores *et al.*, 2005). Una característica de la apoptosis es la degradación del DNA por acción de endonucleasas dependientes de Ca²⁺/Mg²⁺. Estas enzimas producen fragmentos de DNA con un tamaño promedio de 180 pb de longitud, los cuales pueden visualizarse en un gel de agarosa como una escalera (Van *et al.*, 1999; Flores *et al.*, 2005). La apoptosis ha sido demostrada en las células foliculares por numerosos autores (Hsueh *et al.*, 1994; Boone y Tsang, 1998; McCormack *et al.*, 1998; Van *et al.*, 1999; Rosales *et al.*, 2000; Flores *et al.*, 2005).

Control hormonal de la atresia folicular

Las gonadotropinas tienen una gran importancia ya que pueden actuar como factores de sobrevivencia previniendo la apoptosis folicular. Los niveles fisiológicos de FSH han mostrado ser capaces de estimular a los folículos antrales tempranos para completar su diferenciación final alcanzando el estado preovulatorio (Chun *et al.*, 1996); por ejemplo, folículos con atresia temprana pueden ser rescatados por la administración de gonadotropinas exógenas. Se ha demostrado que en ratas inmaduras hipofisectomizadas y tratadas con FSH, disminuye la apoptosis folicular en las células de la granulosa. Además, tratamientos con FSH o hCG/LH previenen el disparo de la fragmentación de DNA por apoptosis en los folículos en cultivo *in vitro* (Hsueh *et al.*, 1994), resaltando la importancia de las gonadotropinas.

Las hormonas esteroides, también participan en el proceso de la atresia folicular, encontrándose concentraciones elevadas de estradiol en las células de la granulosa de los folículos dominantes, en comparación con los folículos subordinados (Evans *et al.*, 2004). También se ha encontrado que el tratamiento con estrógenos incrementa el crecimiento folicular y el índice de mitosis de las células de la granulosa; en contraste, los andrógenos disminuyen el peso ovárico y causan deterioro de los folículos por incrementar el número de células de la granulosa picnóticas y ovocitos degenerados (Hsueh *et al.*, 1994), es decir, los cambios en los niveles de esteroides foliculares están relacionados en el inicio de la atresia.

Otras hormonas como activina e inhibina, que modulan la secreción de FSH, han sido involucradas en la atresia folicular. La inhibina es un heterodímero ligado por puentes disulfuro con una subunidad α común y dos subunidades β . En contraste, la activina está formada por dimerización de las cadenas β de la inhibina ($\beta A\beta A$, $\beta A\beta B$, y $\beta B\beta B$). La inhibina puede actuar como un antagonista fisiológico de la acción de la activina y de esa manera inhibir el crecimiento

folicular y la diferenciación (Evans *et al.*, 2004).

Los factores de crecimiento también han demostrado su participación en la atresia de los folículos. Se ha demostrado que algunos factores de crecimiento actúan como inhibidores de la apoptosis tal como es el caso de EGF, TGF α o bFGF, IGF-I y SCF (Hsueh *et al.*, 1994; Chun *et al.*, 1996; Blondin *et al.*, 1996). Así, la presencia de EGF ha sido identificada en los folículos preovulatorios y cuerpo lúteo del ovario humano. Mientras que otros factores combinados como TGF α con TGF- β inducen apoptosis en las células de la teca (Foghi *et al.*, 1998a). El RNAm de TGF α y bFGF está presente en las células foliculares, los niveles de TGF α aumentan después de la estimulación por FSH.

La apoptosis de las células de la granulosa de los folículos seleccionados puede ser prevenida por acciones paracrinas de EGF/TGF α producidas por la teca o por acciones autocrinas o paracrinas de bFGF sintetizada por las células de la granulosa. También TGF α puede servir en el rol autocrino en la regulación de la atresia folicular (Hsueh *et al.*, 1994).

Existen otros agentes que pueden estimular la atresia folicular, por ejemplo Hsueh *et al.* (1994) mencionan que la IL-6 estimula la fragmentación de DNA por apoptosis en las células de la granulosa, por lo que IL-6 puede ser un factor intrafolicular atresiogénico, mientras que IL-1 β actúa como un factor de sobrevivencia folicular (Chun *et al.*, 1996). Adicionalmente, el RNAm del receptor de Fas ha sido encontrado en el ovario de ratón, el receptor Fas pertenece a la familia de TNF y se relaciona con Fas Ligand, una proteína transmembranal de 31-KDa (Foghi *et al.*, 1998a), se ha mencionado que el sistema Fas/Fas Ligand, está involucrado en la eliminación por apoptosis de células de la granulosa y de la teca durante la atresia folicular (Rosales y Guzmán, 2008).

Se ha mencionado que VEGF funciona como un factor de sobrevivencia para

células endoteliales de humano en cultivo ya que induce la expresión de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y A1 (Ferrara, 1999). En un estudio realizado por Greenaway *et al.* (2004) también se demostró el efecto citoprotector de VEGF en células no endoteliales como son las de la granulosa de los folículos evitando la muerte celular por apoptosis de estas células.

Mecanismo molecular de atresia

El mecanismo por el cual los factores hormonales y otras moléculas regulan la apoptosis que ocurre en la atresia folicular no es totalmente comprendido hasta el momento. Sin embargo, se sabe que la apoptosis en este proceso puede ser iniciada por una gran variedad de señales de muerte, tales como metabolismo, potencial redox, ceramidas, movilización de Ca^{2+} , y activación o inactivación de proteínas de la familia Bcl-2 (Rosales y Guzmán, 2008). La proteína Bcl-2 de 32 KDa está asociada con la mitocondria, retículo endoplásmico y envoltura nuclear, y es capaz de bloquear la muerte celular por apoptosis, ya que actúa como supresor de la apoptosis en una amplia variedad de tejidos (Foghi *et al.*, 1998b), así como en el ovario de varias especies (Tilly, 1996).

La sobre-expresión de Bcl-2, ha mostrado suprimir la muerte celular en diversas líneas celulares *in vitro*, y en diferentes tejidos de ratones transgénicos, además es capaz de suprimir la peroxidación de lípidos y prevenir el daño celular al actuar como trampa de radicales libres. La expresión de Bcl-2 ha mostrado ser regulada por $TGF\alpha$ y $TGF\beta$ (Foghi *et al.*, 1998b). Sin embargo, existen miembros de la familia de Bcl-2 que tienen actividad apoptogénica, como es el caso de Bax, que al sobre-expresarse acelera la muerte celular por apoptosis (Hsueh *et al.*, 1994).

Otros integrantes de Bcl-2 con actividad apoptogénica son: Bad, Bim, Bid, Bok (Quirk *et al.*, 2004; Rosales y Guzmán, 2008). Bax probablemente actúa independientemente de la heterodimerización de Bcl-2 para inducir apoptosis,

lo que sugiere que esa proteína juega un papel importante en la vida o muerte de las células ováricas (Tilly, 1996). Otros genes como *Bcl-xL*, son procesados alternativamente como reguladores positivos (isoforma corta, inductor de muerte) y negativos (isoforma larga, supresor de muerte) por la vía de muerte celular (Tilly, 1996).

Los efectores primarios de la apoptosis son las cisteínoproteasas, conocidas como caspasas (cysteine aspartate-specific proteases), que residen en la célula en forma inactiva hasta que se dispara la apoptosis. Las caspasas, son una familia de enzimas relacionados a la interleucina 1 β (Boone y Tsang, 1998; Rosales y Guzmán, 2008).

La activación de las caspasas puede efectuarse de tres formas distintas: a) activación de una caspasa por otra caspasa; b) unión de cofactores o coenzimas; y c) activación de las caspasas por concentraciones elevadas, preexistentes de las mismas. La acción de las caspasas es llevar a cabo la activación de una enzima cuya función es degradar al ADN, sus siglas en inglés son CAD (ADNasa activada por caspasas) (Flores *et al.*, 2005).

Las caspasas pueden ser divididas en “iniciadoras” como las caspasas 8 y 9, y “efectoras” como la 3, 6 y 7 (Rosales y Guzmán, 2008). La cascada de proteólisis comienza con la activación de la caspasa-8 que conduce a la activación de la caspasa-3, que es el principal efector de la muerte celular. La caspasa 3 es activada por una variedad de señales apoptóticas incluyendo activación de Fas, radiación, y agentes farmacológicos (Boone y Tsang, 1998).

La mitocondria sirve como centro de integración de señales de apoptosis contra sobrevivencia (Quirk *et al.*, 2004). Las señales extracelulares y las señales internas, como el daño del DNA, inician la apoptosis al causar la salida del citocromo c de la mitocondria hacia el citoplasma. El citocromo c liga al factor activador de la apoptosis (Apaf)-1 y a continuación la procaspasa-9, forma un complejo conocido como **apoptosoma** (Flores *et al.*, 2005; Rosales y Guzmán, 2008). De modo que el apoptosoma activa la cascada de caspasas, incluyendo la caspasa 3 (Quirk *et al.*, 2004). Smac-Diablo y el factor inductor de

apoptosis (AIF) son proteínas proapoptóticas adicionales que salen de la mitocondria cuando se daña su membrana, mientras que las proteínas inhibitoras de apoptosis (IAP) en el citoplasma pueden prevenir la activación de las caspasas, las cuales son inhibidas por Smac-Diablo (Quirk *et al.*, 2004).

Los receptores de muerte celular, son miembros de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral. El más estudiado es el receptor de membrana **Fas**, el cual al interactuar con su ligando (FasL) estimula en el citoplasma al “dominio de muerte” de Fas. Eso conduce a la activación de la cascada de las caspasas (Quirk *et al.*, 2004). En las células de los folículos, las caspasas pueden ser activadas por dos vías: 1) receptores de superficie Fas/FasL, y 2) proteínas de la familia Bcl-2 (Rosales y Guzmán, 2008; Greenaway *et al.*, 2004).

B. RELACIÓN DE VEGF CON HORMONAS PROTEICAS Y ESTEROIDES

Recientemente, se ha observado una relación interesante entre VEGF y sus receptores con hormonas protéicas y esteroides, la cual ha sido asociada con el crecimiento de los folículos desde primarios hasta preovulatorios, y posteriormente con el cuerpo lúteo.

Danforth *et al.* (2003) observaron que la aplicación directa de la proteína recombinante de VEGF a los ovarios de ratas inmaduras incrementa el número de folículos preantrales, y que dicha respuesta es dosis dependiente, donde una dosis de 500 ng tuvo una respuesta favorable comparada con 1000 ng. Además, se observó una respuesta similar cuando se aplicaron 50 µg de estrógenos, en ambos casos hubo un incremento de un 75-100% de folículos primarios y secundarios en las ratas.

Existen evidencias de la relación de VEGF con las gonadotropinas, Navindranath *et al.* (1992) realizaron un estudio donde aplicaron un potente

antagonistas de GnRH y observaron que la expresión de RNAm de VEGF disminuye, lo cual permite pensar que la producción de VEGF depende de gonadotropinas durante el ciclo ovárico. Quintana *et al.*(2001) demostraron la producción de VEGF en células de la granulosa en respuesta a FSH, LH y hCG.

Barboni *et al.* (2000) realizaron un tratamiento en cerdas con inyección intramuscular con 1250 UI de eCG; después de 30 h de la aplicación se observó una elevación de los niveles de VEGF en las células de la granulosa en los folículos mayores de 5 mm de diámetro. Posteriormente, Mattioli *et al.* (2001) confirmaron que eCG estimula la producción de VEGF en las células de la granulosa de cerda después de 40 h de aplicación intramuscular del tratamiento, mientras que las células de la teca mantienen niveles constantes de RNAm, independientemente del tamaño folicular o la estimulación hormonal.

En el caso de los receptores VEGF-R1 y VEGF-R2, Shimizu *et al.* (2003a) observaron que tras una inyección de eCG en cerdas se incrementaba la expresión de RNAm de ambos receptores, tanto en folículos pequeños (<4mm), como en medianos (4-5mm) y grandes (>5mm). Posteriormente, en otro estudio de Shimizu *et al.* (2003b), inyectaron fragmentos del gene de VEGF en la zona medular del ovario junto con la aplicación de eCG en cerdas, encontrándose que el número de folículos mayores de 5mm se incrementaba, mientras que con la administración sola de eCG el incremento era menor.

En el caso de hCG, Christenson y Stouffer (1997) observaron en células de la granulosa de mono en cultivo, que la producción de VEGF aumentaba considerablemente cuando el cultivo era enriquecido con 100ng/ml de hCG comparado con el grupo control.

Además, dicha producción era mayor en células de la granulosa luteinizadas, con la misma dosis de hCG. Neulen *et al.* (1998) observaron que después de siete días de la aplicación de hCG en células de la granulosa de humano en cultivo aumenta la expresión de RNAm de VEGF. Lo cual también fue

observado por Hazzard *et al.* (1999) en células de la granulosa de macaco y también por Gómez *et al.* (2004) en células de la granulosa de rata.

Los hallazgos fueron similares a los observados por Barboni *et al.* (2000) en cerdas con posterioridad a la inyección de hCG. Quintana *et al.* (2001), realizaron un experimento en células de la granulosa en cultivo aplicando hCG y notaron que la producción de VEGF en dichas células aumentó en relación al grupo control.

En un estudio en cerdas realizado por Barboni *et al.* (2000), tras la administración de hCG indujo una marcada elevación de VEGF que posteriormente se redujo en la cavidad folicular, lo que causa una reducción en los niveles de RNAm de VEGF en las células de la granulosa sin afectar a las células de la teca. Gómez *et al.* (2003) observaron que en células de la granulosa de rata la expresión de VEGF se incrementaba con posterioridad a las 48 horas del tratamiento con hCG.

En cuanto a las hormonas esteroides, se ha encontrado que la progesterona estimula la expresión de VEGF en el útero de rata (Koos, 1995), así como en células cancerosas, Shimizu y Miyamoto (2007) demostraron que progesterona estimula la expresión de VEGF-120 y su receptor VEGF-R2, e inhibe la expresión de RNAm de VEGF-164 en células de la granulosa en cultivo. Los estrógenos también estimulan la expresión de VEGF en útero de rata (Koos, 1995). Se sabe que los estrógenos estimulan la expresión de RNAm de VEGF en las células de la granulosa *in vivo* e *in vitro* de bovino (Shimizu y Miyamoto, 2007).

III. JUSTIFICACIÓN

El destino de los folículos puede cambiar de acuerdo a la presencia o ausencia de gonadotropinas (LH, FSH) o de otros factores como estradiol e inhibina. FSH es esencial para inducir el crecimiento de los folículos. Posteriormente los niveles de FSH caen durante la selección del futuro folículo dominante, dicha disminución se debe a que el líquido folicular contiene inhibina y estradiol, que son capaces de inhibir la liberación de FSH en la hipófisis y con ello evitan el desarrollo y producen la atresia de los folículos que no fueron seleccionados como dominantes (García *et al.*, 2001; Hernández *et al.*, 2004).

Durante la selección se ha observado que el folículo dominante posee una vascularidad mayor en las células de la teca, que los folículos subordinados de la misma cohorte. El desarrollo vascular provee al folículo de un suministro preferencial de factores de crecimiento, gonadotropinas, oxígeno, precursores esteroides y otras sustancias necesarias para su desarrollo (Zimmerman *et al.*, 2001).

El desarrollo vascular, depende de la expresión de factores que lo promuevan, entre los que destaca el Factor de Crecimiento Endotelio Vascular (VEGF) (Redmer y Reynolds, 1996). VEGF ha demostrado ser fundamental en el reclutamiento (Zimmerman *et al.*, 2001), la selección (Shimizu *et al.*, 2007a) y la dominancia de los folículos (Grazul-Bilska *et al.*, 2007), así como en la formación del cuerpo lúteo (Berisha *et al.*, 2000a) y su ausencia o la disminución de su expresión está relacionado con la presentación de la atresia folicular (Kaczmarek *et al.*, 2005). Aun cuando se sugiere que se requiere de la acción combinada de FSH y VEGF para que los folículos se mantengan alejados de la atresia folicular, se desconoce si la eliminación de la producción de uno de estos dos factores afecta directamente la producción del otro. Por lo anterior, en este trabajo nos propusimos conocer las diferencias en el patrón de expresión de VEGF y sus receptores entre folículos dominantes del día del estro y dominantes del día 6 del ciclo estral y día 6 del ciclo en fase inicial de atresia provenientes de vacas.

IV. HIPOTESIS

La aplicación de líquido folicular en vacas produce en los folículos dominantes una disminución en la expresión del RNAm del Factor de Crecimiento Endotelio Vascular y de sus receptores: VEGF-R1, sVEGF-R1 y VEGF-R2.

V. OBJETIVOS

a. Objetivo General

Conocer la expresión del RNAm de VEGF y sus receptores y evaluar los cambios ocasionados en la expresión de estos genes por efecto de la fase de dominancia en la que se encuentre el folículo.

b. Objetivos Específicos

Conocer la expresión de VEGF y sus receptores en folículos dominantes del día del estro.

Conocer la expresión de VEGF y sus receptores en folículos dominantes del día 6 del ciclo estral.

Conocer la expresión de VEGF y sus receptores en folículos dominantes del día 6 cuya atresia se indujo por la aplicación de líquido folicular.

Comparar la expresión de los RNAm de VEGF y sus receptores entre los tres tipos de folículos dominantes (día del estro, día 6 del ciclo estral y día 6 del ciclo en fase inicial de atresia).

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

Lugar de realización

El estudio se realizó en el campo experimental “Las Margaritas” del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP), ubicado en Hueytamalco, Puebla. Así como en el Departamento de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), y en el laboratorio de Bioquímica de la Reproducción de la Unidad Xochimilco de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-X).

Obtención de Líquido Folicular Libre de Esteroides

El líquido folicular se colectó de ovarios de vacas sacrificadas en un rastro local. Posterior al sacrificio los ovarios se transportaron sobre hielo al laboratorio de Bioquímica de la Reproducción de la UAM-X, el líquido se obtuvo por punción con una jeringa de 5 ml de los folículos mayores de 8 mm de cada ovario. Se puncionaron los folículos necesarios hasta obtener un total de 150 ml de líquido.

El líquido folicular se procesó de acuerdo al método descrito por Hernández *et al.* (1997), como sigue: se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos a 4 °C para la separación de detritos. Se separó el sobrenadante y con el fin de remover las hormonas esteroides se le adicionó 10 mg/ml de carbón activado y 0.1 mg/ml de dextrán. Se mantuvo en agitación magnética por 1 hora y se centrifugó a 12000 rpm durante 30 minutos a 4 °C, para separar las partes de carbón y dextrán.

El proceso de centrifugación se repitió 4 veces y finalmente el sobrenadante se filtró con papel filtro del número 1. Al líquido folicular obtenido de esta forma se le adicionaron 100 UI/ml de penicilina G, y se conservó en congelación a -20 °C hasta su uso. En la figura 3 se representa el diseño experimental realizado.

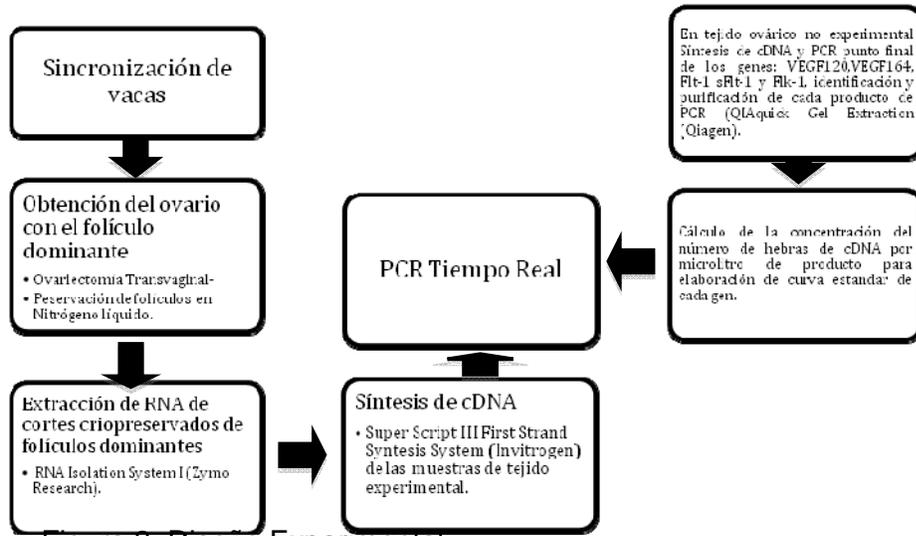


Figura 3. Diseño Experimental.

Esquema de Sincronización de la Ovulación

En trabajo se realizó con 15 vacas cruce de cebú distribuidas en 3 grupos con 5 animales cada uno y sincronizados de acuerdo a lo que se muestra en la figura 4. El grupo D6 incluyó vacas ovariectomizadas el día 6 del ciclo estral; en el grupo D6LF, vacas que fueron tratadas con 10 ml de líquido folicular libre de esteroides, cada 8 horas el día 5 del ciclo estral y ovariectomizadas el día 6 y el grupo Estro, fueron vacas ovariectomizadas el día del estro, 12 horas después de la aplicación de GnRH.

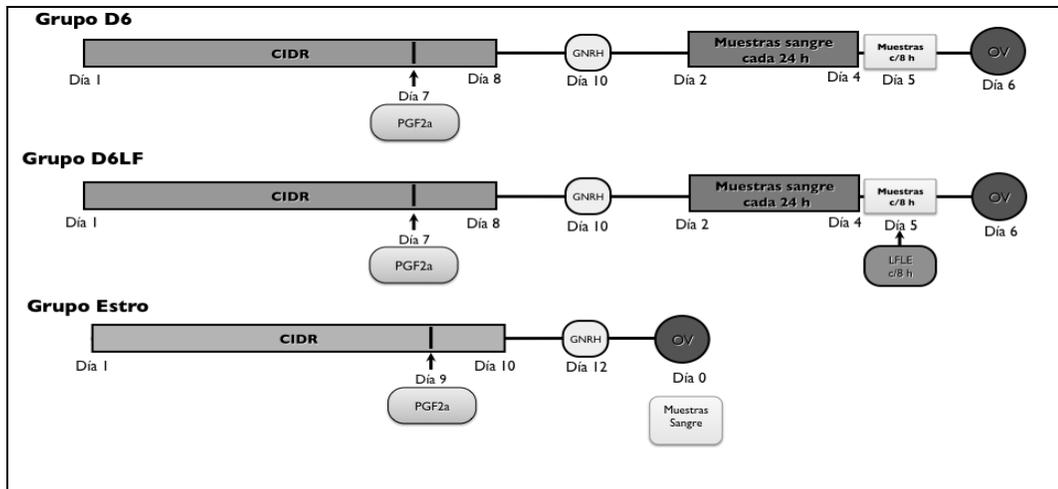


Figura 4. Esquema de Inducción de Ovulación. Progesterona: CIDR, Pfizer (Progesterona al 10%, 1.9 g). PGF2a: Prosvlin C (Cloprostenol, 250 mcg). GnRH: Conceptal, Intervet (Buserelina, 0.010 mg). LFLE: Líquido Folicular Libre de Esteroides (10 ml cada 8 horas). Ov: Ovariectomía unilateral.

Muestras de Sangre

A los animales de los grupos D6 y D6LF se les tomaron muestras de sangre cada 24 horas de la vena coccígea con el uso de tubos BD-Vacutainer a partir del segundo día del estro hasta el cuarto día, en el quinto día las muestras fueron tomadas cada 8 horas y una muestra más en el sexto día previo a la ovariectomía. A los animales del grupo Estro se les tomó una muestra previa a la ovariectomía. Las muestras de sangre obtenidas de los animales fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos, para obtener el suero, el cual se mantuvo a -20°C hasta la determinación de Progesterona.

Ovariectomía

En todos los animales del estudio se identificó el folículo dominante de interés por medio de ultrasonografía, una vez identificado se procedió a realizar la ovariectomía unilateral vía vaginal. Para la obtención de los ovarios, los animales fueron tratados con xilacina al 2% (0.1 mg/kg) por vía intramuscular y 5 ml de lidocaína por cada 450 kg de peso vía epidural. Previo a la cirugía se lavó y rasuró la región perianal de los animales.

Tratamiento del Folículo Dominante

Los ovarios se recibieron en un amortiguador de fosfatos (PBS) preparada con agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) (0.01M. pH 7.4). Se realizó un esquema del ovario recuperado de cada animal y se cortó con un bisturí la parte del ovario donde se encontró el folículo de mayor tamaño (folículo dominante). Los trozos de ovarios se lavaron dos veces con PBS-DEPC e inmediatamente fueron expuestos a vapores de nitrógeno hasta observar que el tejido estaba congelado, luego se colocaron en viales identificados con el número de animal y se almacenaron en nitrógeno líquido a -196°C, hasta que se procedió a realizar los cortes y la extracción de RNA.

Extracción de RNA

Para la extracción de RNA se siguieron las indicaciones de estuche comercial obtenido para el aislamiento de RNA de tejidos congelados (Pinpoint Slide RNA Isolation System I, Zymo Research, Orange, Ca., número de catálogo R1003). Se realizaron cortes del folículo dominante de 20 μm de grosor con un criostato a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Cryo Cut II, American optical, U.S.A.). Los cortes se fijaron sobre porta-objetos, los cuales fueron identificados con el número de animal.

Las laminillas se pusieron a secar a 60°C por 30 minutos y luego fueron sumergidas en etanol al 95% por 1 hora para fijar el corte. Posteriormente, las muestras se pusieron a secar por 30 minutos a temperatura ambiente y bajo el microscopio estereoscópico se aplicó con un pincel la solución PinPoint en el contorno externo de los folículos. La solución PinPoint consiste en una película que se extiende sobre el tejido que está en la laminilla y permite, con el uso de una hoja de bisturí, para separar el tejido de interés.

Se dejó secar la muestra cubierta con la solución de PinPoint por 30 a 45 minutos a temperatura ambiente. Luego con el uso de un bisturí, se removió el tejido cubierto con la solución PinPoint y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml. Se colocaron 20 cortes de cada folículo dentro de cada tubo. Los tubos se centrifugaron brevemente a 10000 rpm para formar un botón con la muestra. A cada tubo se le agregaron 200 μl de amortiguador de extracción de RNA y se resuspendió pipeteando varias veces hasta ver el tejido disuelto. Luego se incubaron por 30 minutos, agitándose vigorosamente cada 5 minutos. Se agregaron 200 μl de etanol al 100% a cada muestra y se incubaron por 10 minutos en hielo. Posteriormente se transfirió cada muestra a una columna de extracción ensamblada sobre un tubo colector y se centrifugaron a ≥ 10000 rpm por un minuto, se desechó lo filtrado y se repitió este paso.

La columna se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 ml libre de RNAsas y se agregaron 8 μl de amortiguador de elución de RNA, directamente a la membrana de la columna. Los tubos se centrifugaron a ≥ 10000 rpm por un minuto para eluir el RNA, este paso se repitió agregando 6 μl de amortiguador

de elución, para obtener un volumen final de 14 μ l, el RNA total obtenido fue almacenado a -70 °C para su uso posterior. El RNA total se cuantificó por espectrofotometría a longitudes de 260 y 280 nm, para verificar que no había contaminación por otras moléculas, además se observó la integridad del RNA por electroforesis en un gel de agarosa al 2%.

Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA se utilizó el estuche comercial SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Life Technology, NY, USA, número de catálogo: 18080-051) y se siguieron las indicaciones para su uso. La reacción se realizó con 400 ng de RNA total, 1 μ l de Random hexamers (50 ng/ μ l), 1 μ l de dNTP Mix y se ajustó a 10 μ l con agua estéril. La mezcla anterior se incubó a 65°C por 5 minutos y se colocó en hielo por al menos 1 minuto. Se preparó la mezcla para la síntesis de cDNA, agregando cada componente de acuerdo al siguiente orden: 2 μ l de 10x RT Buffer, 4 μ l de 25 mM de MgCl₂, 2 μ l de 0.1 M DTT, 1 μ l de RNasa Out (40 U/ μ l) y 1 μ l de Super Script III RT (200 U/ μ l). Se juntaron ambas mezclas y se dejó incubar por 10 minutos a 25°C y luego por 50 minutos a 50°C. Las reacciones se terminaron por calentamiento a 85°C durante 5 minutos. Las muestras se colocaron en hielo y luego se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Oligos y Sondas para la identificación de los diferentes genes

Se verificó la amplificación de cada uno de los genes, primero por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) punto final y posteriormente se realizó el análisis cuantitativo del RNA de VEGF120, VEGF164 y los receptores VEGF-R1, sVEGF-R1, VEGF-R2 por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo real (qPCR). Las secuencias de todos los genes fueron obtenidas a partir de las bases de datos del GenBank. Los oligos y sondas se diseñaron con el software *Primer Express ver. 2.0* (Applied Biosystems). Para ello se ubicaron las secuencias de exones de cada isoforma de VEGF y de los receptores de acuerdo a las variantes alternativas de cada uno. Las secuencias de oligos y sondas así como su clave de acceso en el

GenBank y tamaño del amplicón para cada gen se muestran en el cuadro 3. En figura 5 se presentan la ubicación de los oligos y sondas en las isoformas de VEGF-120 y VEGF-164 y para los receptores de VEGF en la figura 6.

Cuadro 3. Oligos y sondas utilizadas para PCR-Tiempo Real.

Gen	Identificación en GenBank	Sentido	Secuencia	Amplicón
VEGF-120	NM_1742216	Forward Reverse Sonda	GAGATGAGCTTCCTACAGCATAACAA GCCTCGGCTTGTCACATTTTT TGTGAATGCAGACCAAAA	85 pb
VEGF-164	Gi:27806356	Forward Reverse Sonda	AATGCAGACCAAAGAAAGATAAAGC GCTTTCTCCGCTCTGAGCAA AGGCAAGAAAATCCCTGTGG	69 pb
VEGF-R1	NW_001493038	Forward Reverse Sonda	ATGCGAGCACCCGAGTATG TCTTTGTGCCAGCAGTCCAA CTGAAATCTACCAGACCAT	65 pb
sVEGF-R1	NW_001493038	Forward Reverse Sonda	CATTAGAGGTGAGCACTGCAACA TTCCTCGTGCTTTTAAATTTGGA AAAGGCTGTTTTCTCTCG	68 pb
VEGF-R2	X94298	Forward Reverse Sonda	CATGGGCTCCGTTCTTTATGTGTAT GCTGGTCGCTAACAGAAGCAATAA CTGAAATCTACCAGACCT	75 pb

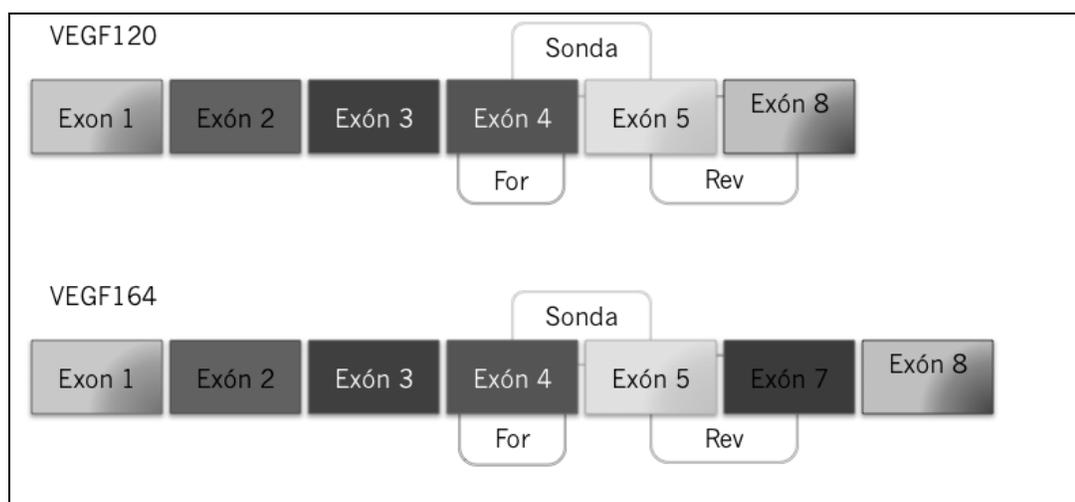


Figura 5. Ubicación de oligos y sonda de las isoformas de VEGF.

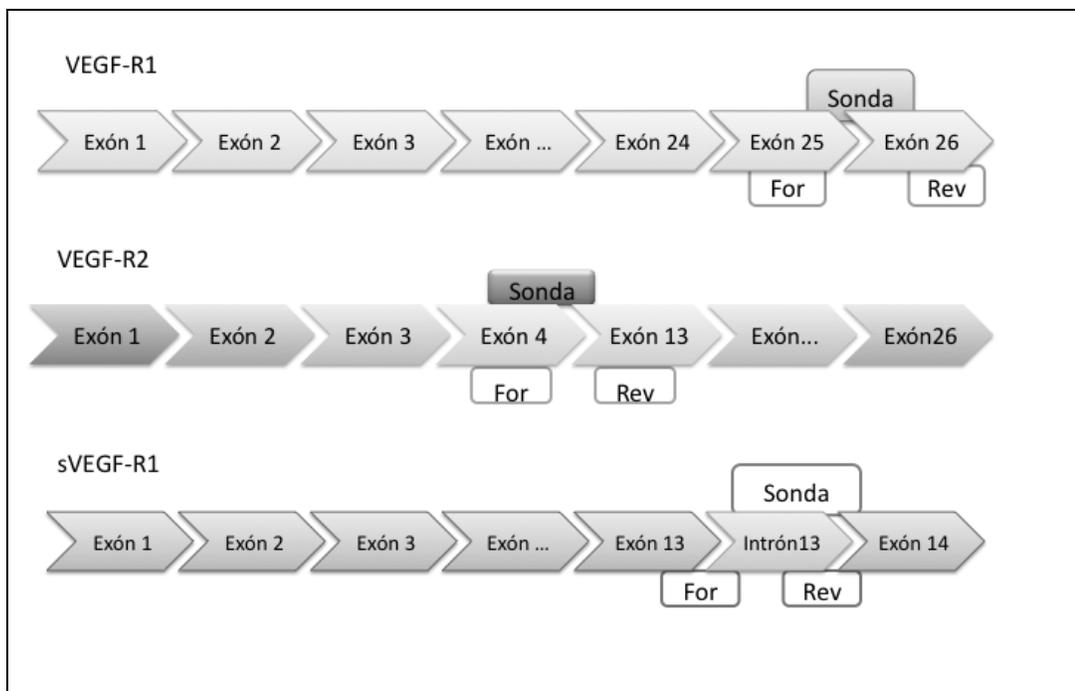


Figura 6. Ubicación de oligos y sondas de los receptores de VEGF.

Amplificación y purificación de fragmentos de los genes para la realización de una curva estándar

Con el propósito de hacer cuantitativa la reacción de qPCR se siguió la metodología de acuerdo a Tricarico *et al.* (2002), en la cual se describe la obtención por PCR de fragmentos génicos, cuya concentración se calcula mediante espectrofotometría, con el objeto de utilizarlos posteriormente en la PCR de tiempo real para realizar una curva estándar que permitirá cuantificar las copias de RNAm de cada gen presentes en las muestras. Para obtener los fragmentos de los distintos genes se realizó una PCR Punto Final utilizando los oligos previamente descritos, de acuerdo a la siguiente reacción: 5 μ l de cDNA, 2 μ l de sonda (5 μ M) + oligos (18 μ M de cada uno de ellos), 15 μ l de PCR Mix (Applied Biosystems) y 8 μ l de H₂O para obtener un volumen final de 30 μ l, dicha mezcla se hizo para cada uno de los genes por duplicado, y una más sustituyendo los 5 μ l de cDNA por H₂O para tener un control negativo, las muestras anteriores se colocaron en un termociclador *Mastercycler gradient*

(Eppendorf, Germany) con las siguientes condiciones: un ciclo a 94°C por 3 minutos; 40 ciclos a 94°C por 15 segundos y 60°C por 1 minuto, así como un ciclo de extensión final a 60°C por 5 minutos.

Se corrió un gel de agarosa al 2 % con el producto de la PCR de cada gen. Se cargaron 25 µl del producto de PCR, 5 µl de amortiguador de muestra (0.25% de azul de bromofenol, 0.25% de xilen cianol y 15% de ficoll en agua) y 5 µl de Bromuro de Etidio para obtener un volumen final de 35 µl. El marcador de peso molecular fue TrackIt 50 bp DNA Ladder (Invitrogen). El gel se dejó correr por 1 hora a 80 volts/50 miliamperios.

El gel se visualizó en un transiluminador *BioChem Darkroom* (UVP Bioimaging Systems) para observar las bandas y se procedió a cortar las bandas del gel que coincidían con el tamaño del amplicón de cada isoforma y receptor. Los productos obtenidos en la rebanada de gel se extrajeron con el estuche comercial *QIAquick gel extraction* (Qiagen, número de catálogo 28704) de acuerdo al siguiente protocolo:

1. El gel cortado se pesó y se colocaron tres volúmenes del buffer QG por volumen de gel.
2. Se dejó incubar a 50°C por 10 minutos, y se disolvió el gel agitando cada 3 minutos durante la incubación.
3. Se agregó un volumen de isopropanol por volumen de gel y se mezcló.
4. La mezcla anterior se colocó en una columna Quiaquick con un tubo de colección de 2 ml y se centrifugó por un minuto.
5. Se desechó lo filtrado y se agregaron nuevamente a la columna 0.5 ml de buffer QG y se centrifugó por un minuto (con la finalidad de remover por completo trazas de agarosa).
6. Para lavar la columna, se agregaron 0.75 ml de buffer PE y se centrifugó por un minuto.
7. Se desechó lo filtrado y se centrifugó por un minuto a 13000 rpm.
8. Para eluir el DNA se colocó la columna sobre un tubo de colección nuevo de 1.5 ml y se agregaron 50 µl de buffer EB, centrifugándose por un minuto.

Una vez purificadas las muestras se midieron en el espectrofotómetro para calcular su concentración. Se tomaron lecturas a 260 nm y se utilizó la siguiente fórmula.

$$\frac{[\quad] \text{ en g/}\mu\text{l} \times (6 \times 10^{23})}{\text{Pares de bases del amplicón} \times 660}$$

El resultado final de la ecuación es el número de copias de cada gen por microL. Se realizaron entonces los cálculos para hacer una curva estándar con valores desde 1×10^0 hasta 1×10^{10} copias que se utilizarían posteriormente en la PCR de tiempo real.

Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real

Con el fin de establecer la concentración de las muestras de cDNA adecuada para el proceso de amplificación, se realizó una titulación usando diluciones del cDNA desde 1:1, 1:10, 1:100 y 1:1000, y se determinó que se usaría la dilución 1:10 para cada gen.

Para la realización de la PCR tiempo real se realizó la siguiente mezcla: 9 μl del cDNA obtenido del folículo dominante (dilución 1:10), 10 μl de la mezcla TaqMan Universal Master Mix, no AmpErase (Applied Biosystems), 1 μl de sonda Taqman +oligos del gen de interés; para obtener un volumen final de 20 μl . Las muestras se colocaron en un termociclador de tiempo real, *AbiPrism 7000* (Applied BioSystems) con las siguientes condiciones: un ciclo inicial a 50°C por 2 minutos y 95°C por 10 minutos; 40 ciclos a 95°C por 15 segundos y 60°C por 1 minuto; un ciclo más a 60 °C por 5 minutos.

Radio Inmuno Ensayo

Para la determinación de Progesterona se tomaron 100 μ l del suero obtenido de las muestras de sangre de los animales, para la realización de RIA en fase sólida (Coat-a-Count, Siemens). Con una sensibilidad analítica de 0.02 ng/ml y con un coeficiente de variación intraensayo de 8.89%.

Análisis Estadístico

Los resultados para los receptores de VEGF (VEGF-R1, sVEGF-R1 y VEGF-R2), así como de las isoformas (VEGF-120 y VEGF-164) son representados como logaritmo natural del número de copias. Los datos se analizaron por medio de un Análisis de Varianza, los datos están expresados como media \pm Desviación Estándar y la comparación de medias entre grupos se realizó por prueba de *t* de Student. Valores de $P < 0.05$ son considerados como estadísticamente significativos. Los análisis estadísticos fueron realizados con el Software GenStat versión 12.0 (VSN International).

VII. RESULTADOS

Concentración de progesterona

Las concentraciones de progesterona obtenidas de cada uno de los animales fueron utilizadas para conocer el estado fisiológico de los animales del D6, D6LF y Estro.

Expresión de las isoformas de VEGF

La expresión del RNAm de las isoformas de VEGF se muestra en la figura 7. La expresión de RNAm de VEGF-120, no mostró diferencias por efecto del tratamiento ($p>0.05$) (D6= 7.7 ± 0.42 ; D6LF= 7.45 ± 0.42 ; Estro= 7.032 ± 0.42).

En cambio, la expresión de VEGF-164 si mostró diferencias significativas por efecto del tratamiento ($p<0.05$).

La mayor expresión del RNAm de VEGF-164 se encontró en el grupo D6LF(8.364 ± 0.4), y la menor en el grupo de Estro (6.313 ± 0.45).

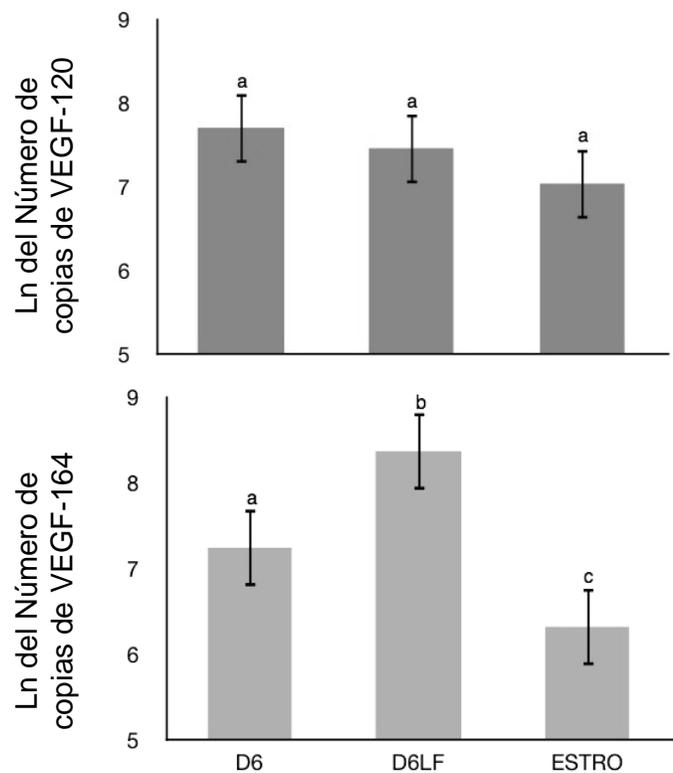


Figura 7. Expresión de RNAm de VEGF-120 y VEGF-164 de los grupos D6, D6LF y Estro. Letras diferentes representan diferencias significativas $P<0.05$.

Expresión de receptores de VEGF

La expresión de RNAm de los receptores de VEGF se representa en la figura 8. De acuerdo a la expresión de RNAm de VEGF-R1 se puede observar que no hubo diferencias significativas ($p>0.05$) entre los animales D6 y D6LF (D6=8.552±0.6; D6LF=8.211±0.6), mientras que el grupo Estro mostró una disminución significativa en la expresión de este receptor (Estro= 4.591±0.6).

En la expresión del RNAm de VEGF-R2 no existieron diferencias significativas entre los grupos D6 y D6LF, mientras que la concentración de RNAm disminuyó de manera significativa ($p<0.05$) en el grupo Estro (D6=8.478±0.74; D6LF= 9.195±0.74 vs Estro= 5.352±0.74) .

La expresión del receptor soluble sVEGF-R1 se incrementó de forma significativa entre los folículos dominantes del grupo D6, los del grupo D6LF y Estro (15.223±0.17, 15.827±0.17 y 16.357±0.17), respectivamente.

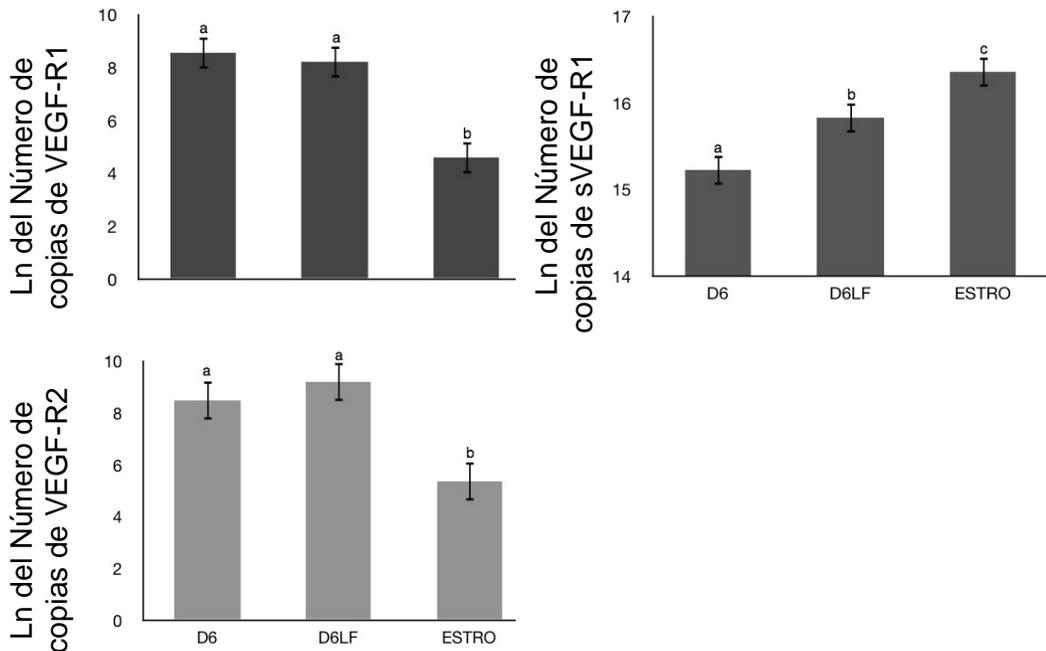


Figura 8. Expresión de RNAm de los Receptores VEGF-R1, VEGF-R2 y sVEGF-R1 de los grupos D6, D6LF y Estro. Letras diferentes representan diferencias significativas $P<0.05$.

VII. DISCUSIÓN

En este trabajo se presenta la expresión del RNAm de VEGF-120, VEGF-164, VEGF-R1, VEGF-R2 y sVEGF-R1, así como las diferencias en el patrón de expresión entre folículos dominantes del día del estro y del día 6 del ciclo y folículos dominantes en etapa temprana de atresia. Este es el primer trabajo donde se reporta la expresión del receptor soluble sVEGF-R1 en folículos de bovino, así mismo la co-expresión de VEGF-R1 y VEGF-R2 en folículos de bovino bajo condiciones *in vivo*.

Diversos autores han demostrado la expresión del RNAm de VEGF en folículos de varias especies, así como en el cuerpo lúteo. A diferencia de la información relativamente extensa que se tiene sobre VEGF, tanto del mensajero como de la proteína, la disponible sobre la expresión de las diferentes isoformas y la función que cada una de ellas desempeña en la dinámica ovárica es sumamente escasa.

Los resultados de este trabajo muestran que la expresión del RNAm de VEGF-120 no fue diferente entre folículos dominantes del día del estro y los del día 6 sanos o atrésicos. De acuerdo a la literatura, un folículo dominante del día del estro mantiene un nivel estrogénico alto, al igual que un folículo dominante del día 6 del ciclo, lo que algunos autores han llamado estrógeno activo con una relación E2/P4 >1 (Grazul-Bislka *et al.*, 2007), mientras que los folículos del grupo D6LF como fuente de inhibina cabría esperar que fueran estrógeno inactivo E2/P4 <1, con dominancia de progesterona en el ambiente folicular; de acuerdo a esto, podemos decir que en nuestro trabajo el ambiente estrogénico o progestacional de los folículos pudo haber influido en la expresión de VEGF120, lo cual difiere de lo reportado por Shimizu *et al.* (2007a), quienes en un estudio *in vitro*, realizado con células de la granulosa procedentes de folículos post-seleccionados de bovino (folículos 11-19 mm de diámetro) encontraron que la expresión de RNAm de VEGF-120 fue mayor que en los pre-seleccionados (7-8.5 mm de diámetro) además, observaron que la aplicación de 1 ng/ml estradiol a los cultivos de células de la granulosa

estimuló la expresión de RNAm de VEGF-120. Estos autores, también reportaron que la expresión del RNAm de VEGF-120 es estimulada por FSH, ya que la adición de 10 ng/ml de esta hormona al cultivo de células de la granulosa aumentó considerablemente su expresión, este último hallazgo tampoco concuerda con lo que nosotros encontramos, ya que en los folículos del día 6 en etapa de atresia temprana se esperaría que hubieran sido menos estimulados por FSH que los que no fueron tratados, sin embargo, la expresión de VEGF-120 no mostró cambios, por lo cual, la expresión de VEGF-120 podría no estar relacionada con el estado fisiológico del folículo.

En otro estudio reportado previamente por Shimizu *et al.* (2003b), en el cual se les inyectó a cerdas fragmentos del gen de VEGF directamente en el ovario (10 µg/ovario), junto con la aplicación de eCG (500 UI), encontrando que la expresión de VEGF-120 fue mayor en las células de la granulosa de los animales a los que se les aplicó eCG. Otro estudio (Lijima *et al.*, 2005) reveló que la inyección del gen de VEGF-120 intraperitoneal en ratas estimula el número de folículos antrales sanos y disminuye la atresia folicular, además se observó que en el grupo al que se inyectó el gen de VEGF-120 (0.8 µg/kg), se elevaron las concentraciones séricas de estradiol con respecto al grupo control.

A diferencia de la isoforma 120, en la expresión del RNAm de VEGF-164 de los folículos dominantes del día 6 del ciclo, sí hubo un efecto significativo del estado fisiológico del folículo dominante. Existen datos donde la aplicación de líquido folicular inhibe el desarrollo e induce atresia folicular (Moser *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1993; Bleach *et al.*, 2001). Si asumimos que esto ocurrió en nuestro experimento, podemos pensar que la mayor expresión de VEGF-164 que observamos en los folículos del día 6 en estado de atresia temprana, es consecuencia de la atresia que se les ocasiona.

Los folículos que entran al proceso de degeneración por atresia, van perdiendo su capacidad para producir estradiol, en principio por la menor producción de aromatasa y posteriormente por la muerte paulatina de las células de la granulosa (Rosales-Torres *et al.*, 2000). Esta situación provoca la dominancia de progesterona sobre el estradiol en el ambiente folicular. Contrario a lo que

nosotros reportamos, Shimizu y Miyamoto (2007) demostraron que la adición de progesterona a cultivo de células de la granulosa de bovino, ocasiona la disminución de la expresión de RNAm de VEGF-164, esta discrepancia podría ser explicada de acuerdo a las condiciones *in Vitro* a las que fueron sometidas las células de la granulosa.

En otro estudio *in vitro* realizado por el mismo autor (Shimizu *et al.*, 2007a), con células de la granulosa de folículos de bovino categorizados como post-seleccionados (folículos de 11-19 mm de diámetro, estrógeno dominantes), se encontró que la expresión de VEGF-164 fue mayor que en los del grupo pre-selección (folículos de 7-8.5 mm de diámetro, progesterona dominante) y que el enriquecimiento del medio con estradiol (dosis de 1 a 100 ng/ml) no modificó la expresión de VEGF-164, ésta solo se mostró ligeramente elevada cuando además se añadió 1 ng/ml de FSH lo cual quiere decir que se requiere de la acción sinérgica entre FSH y estradiol para la expresión de VEGF164.

En un estudio previo realizado por Shimizu *et al.* (2003b), en el cual se inyectaron fragmentos del gen de VEGF (10 µg/ovario) en el ovario de cerdas junto con una dosis de 500 UI de eCG, la expresión de VEGF-164 demostró ser regulada positivamente por gonadotropinas como FSH. Lijima *et al.* (2005), de forma similar, inyectaron fragmentos del gen de VEGF-164 de forma intraperitoneal en ratas a razón de 8 µg/kg y notaron que el tratamiento incrementó el número de folículos antrales sanos y disminuyó la cantidad de folículos atrésicos. Similarmente en cultivos de células de la granulosa de bovino, Shimizu y Miyamoto (2007) demostraron que la adición de 1 ng/ml de progesterona al medio de cultivo no afectó la expresión de VEGF-164 en las células de la granulosa, mientras que al aumentar la dosis a 10 ng/ml de progesterona, la expresión de RNAm de VEGF-164 disminuyó significativamente, y cuando el medio tenía 10 ng/ml de progesterona más 1 ng/ml de estradiol, la expresión de VEGF-164 aumentó, lo que parece indicar que la expresión de RNAm de VEGF-164 está regulada por los esteroides que los folículos producen en los diferentes estados fisiológicos del desarrollo folicular.

Los resultados de los autores citados indican una asociación entre la progesterona y la expresión de VEGF-164, sin embargo nuestros resultados indican que los folículos que asumimos como atrésicos por el tratamiento de las vacas con líquido folicular 24 horas antes de la ovariectomía ocurrida en el día 6 del ciclo y los cuales se esperaba estuvieran bajo un ambiente folicular de progesterona, la expresión de VEGF-164 fue significativamente mayor que en los ovarios obtenidos del día 6 sin tratamiento y de los del día del estro, en los cuales se asume un ambiente de dominancia del estradiol. Esta discrepancia puede ser debida a las secuencias a partir de la cual se diseñaron los oligos. La secuencia de los oligos diseñados se ubican en el exón 4 para el primer sentido y entre los exones 5 y 7 del gen de VEGF para el primer antisentido, con lo cual se pueden amplificar las isoformas VEGF-164a que tiene efecto angiogénico y VEGF-164b con efecto antiangiogénico.

Recientemente se ha demostrado que el origen de las isoformas angiogénicas y antiangiogénicas de VEGF es debido a que el exón 8 da origen a dos sub-exones, exón 8a que da origen a las isoformas angiogénicas en el sitio de corte distal en el exón 8, y el exón 8b que da origen a las isoformas antiangiogénicas en el sitio de corte distal del exón 8 (Nowak *et al.*, 2008). Se ha reportado que en folículos atrésicos disminuye de forma importante la irrigación folicular (Grazul-Bilska *et al.*, 2007), lo cual podría deberse a una mayor expresión de las isoformas antiangiogénicas de VEGF, más que a la disminución de VEGF total, como han reportado algunos autores (Taylor *et al.*, 2007; Redmer y Reynolds *et al.*, 1996). Para amplificar sólo la isoforma angiogénica, el oligo antisentido debió ser diseñado en la secuencia de la parte proximal del exón 8, la cual es una fracción exclusiva de esta variante de la isoforma.

Otra posible explicación a la mayor expresión de VEGF-164 en los folículos dominantes en atresia temprana, es que probablemente la aplicación del líquido folicular provocó la atresia folicular al disminuir la irrigación sanguínea, como suele ocurrir en folículos de esta condición (Redmer y Reynolds *et al.*, 1996). La pérdida de irrigación provoca hipoxia, la cual en principio por intermediación del factor inducible por hipoxia (HIF), provoca el

estímulo para la mayor expresión de VEGF. Se conoce que existe una fuerte relación entre la disminución en la presión de oxígeno en el líquido folicular, los niveles de producción de VEGF y el desarrollo de la red sanguínea de un folículo (Bianco *et al.*, 2005), sin embargo cuando el folículo no logra reponer su red vascular seguirá avanzando en el proceso de la atresia hasta la muerte de todas sus células.

Aún cuando se desconoce la expresión de cada isoforma de VEGF durante la transición del folículo dominante a cuerpo lúteo, se tiene alguna información sobre VEGF total. Robinson *et al.* (2007) realizaron un estudio en folículos preovulatorios de bovino, reportando que la proteína de VEGF antes del pico de LH tenía una concentración menor, dicha concentración podría deberse a la necesidad de regular el flujo sanguíneo en el folículo para evitar una hemorragia durante la ovulación, recuperando inmediatamente la expresión de VEGF para la formación del CL. A este respecto Chowdhury *et al.* (2009) demostraron, en folículos dominantes de oveja, la disminución en la expresión del RNAm y de la proteína de VEGF antes del pico de LH, con una baja expresión y que se eleva durante el pico de LH. El periodo de transición, aunque corto, con disminución de la expresión de VEGF, será seguido de un periodo de intensa angiogénesis, que inicia con cambios bioquímicos y morfológicos después de la oleada de LH (Reynolds y Redmer, 1999).

Se sabe que los efectos de VEGF están mediados principalmente por dos receptores: VEGF-R1 y VEGF-R2. Se conoce que VEGF-R1 es un receptor con alta afinidad hacia su ligando, algunos autores le han llamado receptor decorativo porque atrae a VEGF, pero tiene baja actividad biológica, sin embargo por su alta afinidad reduce la disponibilidad de VEGF para ligarse a VEGF-R2 (Kaczmarek *et al.*, 2009). VEGF-R2 tiene baja afinidad (Kd de 75-125 pM, Ferrara, 1999) para VEGF, menor que VEGF-R1 (Kd de 10-30 pM, Berisha *et al.*, 2000a), sin embargo es considerado como el principal mediador de los efectos mitogénicos, angiogénicos y de permeabilidad vascular de VEGF (Kaczmarek *et al.*, 2009).

La expresión del RNAm de VEGF-R1 y VEGF-R2 ha sido demostrada en células de la granulosa de bovino en cultivo (Einspaner *et al.*, 2002) y en folículos ováricos fetales de bovino (Yang y Fortune, 2007). En folículos de rastro, Berisha *et al.* (2000b) observaron que en las células de la teca de los folículos considerados como dominantes, debido a la concentración de estradiol en su líquido folicular (>180 ng/ml), la expresión de RNAm de VEGF-R1 y VEGF-R2 fueron elevadas, mientras que en las células de la granulosa de los mismos folículos, la expresión de estos receptores fue menor.

Los resultados de nuestro trabajo en donde el análisis de la expresión de estos dos receptores se realizó en células foliculares sin distinción entre teca y granulosa, señalan que la expresión del RNAm de VEGF-R1 y VEGF-R2, fue similar en folículos dominantes del día 6 del ciclo con y sin tratamiento con líquido folicular, y disminuyó de forma significativa en los folículos dominantes del día del estro. De acuerdo con Shimizu *et al.* (2007b) la expresión de VEGF-R2, es estimulada en ratas por la aplicación del gen de VEGF, mientras que VEGF-R1 no tuvo cambios significativos, lo que indica que VEGF podría estimular la producción de VEGF-R2 para ejercer sus funciones angiogénicas. Estos resultados parecen aplicarse en nuestro caso porque efectivamente la expresión del RNAm de VEGF-R1 y VEGF-R2 aumentó cuando también fue mayor la expresión de VEGF, especialmente de VEGF-164.

Los resultados de los experimentos de Shimizu *et al.* (2007a) también indican que los cambios más importantes en la expresión del RNAm ocurrieron en VEGF-R2 más que en VEGF-R1. El estudio realizado con células de la granulosa de folículos de bovino de 11-19 mm de diámetro, considerados dominantes, demostró que expresaron la misma cantidad de RNAm de VEGF-R1 que los folículos de menor tamaño (7-8.5 mm de diámetro), mientras que en el caso de VEGF-R2, su expresión fue mayor. En el caso de las células de la teca, la expresión de RNAm de ambos receptores no mostró diferencias significativas, concluyéndose que los cambios dinámicos en la expresión de ambos receptores se restringen a las células de la granulosa. En el mismo estudio utilizando células de la granulosa en cultivo, se observó que al agregar

1 ng/ml de FSH al medio, la expresión de RNAm de VEGF-R2 aumentaba en relación al grupo control (0 ng/ml); además se observó que si se agregaba 1 ng/ml de estradiol y 5 ng/ml de FSH al medio, la expresión de dicho receptor aumentaba, sugiriendo que la expresión del VEGF-R2 es mediada por la acción conjunta de gonadotropinas y esteroides. Nosotros no pudimos observar esta dependencia hormonal, ya que no hubo diferencia en la expresión del RNAm de ambos receptores entre los folículos dominantes del día 6 del ciclo y los dominantes del día 6 tratados con líquido folicular, en los que se esperaba que hubiera un menor estímulo de FSH y menor concentración de estrógenos por efecto del líquido folicular.

En nuestro trabajo, se consideró a las vacas en el día 0 del ciclo cuando se sometieron a sincronización y con un posterior tratamiento de GnRH y se ovariectomizaron 16 horas después. Según resultados de Berisha *et al.* (2008) la expresión de los receptores VEGF-R1 y VEGF-R-2, se mantuvo sin cambios, con una concentración relativa baja hasta 20 horas después de la aplicación de GnRH y se nota una marcada disminución a partir de las 25 horas de la aplicación de GnRH. Esto demuestra un claro efecto de LH sobre la expresión de ambos receptores, lo cual podría explicar que en nuestros resultados hayamos encontrado una mayor expresión de ambos receptores en los folículos dominantes obtenidos en el día 6 del ciclo con y sin tratamiento con líquido folicular, que no han sido expuestos a una frecuencia alta de picos de LH como lo estuvieron los del día 0 del ciclo.

Trabajos realizados con cuerpo lúteo, han demostrado que el receptor que tiene mayores cambios en distintos momentos fisiológicos es VEGF-R2. Sugino *et al.* (2000) en cuerpo lúteo de mujeres, demostraron la expresión de RNAm de ambos receptores. Sin embargo observaron que la expresión de RNAm de VEGF-R1 es constante en el cuerpo lúteo temprano, así como en el cuerpo lúteo tardío, mientras que en la regresión del cuerpo lúteo la expresión es baja. En el caso del receptor 2, la expresión de RNAm es elevada en el cuerpo lúteo temprano, mientras que en la regresión del cuerpo lúteo la expresión del RNAm es baja.

Boonyaparakob *et al.* (2003) observaron que en cuerpo lúteo de cerdas la expresión de RNAm de VEGF-R1 es baja 4 días después del estro, posteriormente sube entre los días 7-10 y finalmente se eleva en los días 13-15. Mientras que para el caso de VEGF-R2, su expresión es mayor durante la formación y mantenimiento del cuerpo lúteo (días 4-10) y posteriormente baja en los días 13-15. De ahí surge la idea acerca de que VEGF-R1 puede actuar como un receptor de atracción de VEGF, dejando menos disponible su ligando para VEGF-R2. Resultados similares obtuvo Berisha *et al.* (2000a), notando un patrón de expresión de RNAm de VEGF-R1 casi continuo a lo largo del ciclo estral, mientras que la expresión de RNAm VEGF-R2 es mayor en la formación del cuerpo lúteo (día 3-4) y baja durante el periodo de regresión (día 18). Del mismo modo, Kaczmarek *et al.* (2007) describe los cambios de la proteína de VEGF-R1 y VEGF-R2 en el cuerpo lúteo de cerdas durante el ciclo estral, describiendo principalmente la expresión elevada de ambos receptores durante el mantenimiento del cuerpo lúteo y una baja expresión en la regresión del cuerpo lúteo. Los resultados que obtuvimos nosotros en este trabajo no apoyan que exista diferencia en la expresión de VEGF-R1 y VEGF-R2, bajo una misma situación fisiológica, ya que en nuestro experimento ambos receptores tuvieron un patrón similar en los tres tratamientos.

El RNAm de VEGF-R1 por un proceso de corte y empalme de manera alternativa de exones puede codificar una forma soluble denominada sVEGF-R1, que posee los dominios de unión al ligando pero carece de la región transmembranal y dominios intracelulares (Sela *et al.*, 2009). Este receptor se une al ligando casi con la misma afinidad que VEGF-R1, ya que tiene una Kd de 10-20 pM (Ferrara, 1999), mientras que la Kd de VEGF-R1 es de 10-30 pM, por lo tanto este receptor soluble actúa como un modulador negativo de la biodisponibilidad de VEGF (Kaczmarek *et al.*, 2009).

La expresión de RNAm de sVEGF-R1 ha sido descrita primeramente en células del endometrio de mujeres (Krussel *et al.*, 1999), en placenta de ratón (Yulong *et al.*, 1999) y también en útero de ratón (Hastings *et al.*, 2003). Recientemente la expresión de RNAm de sVEGF-R1 ha sido localizada en el cuerpo lúteo de

cerdas (Kaczmarek *et al.*, 2009). sVEGF-R1 tiene un papel principal en la generación de enfermedades vasculares como la preclampsia o crecimiento retardado del útero (Gruemmer *et al.*, 2005b). En este trabajo pudimos demostrar la presencia de sVEGF-R1 en folículos dominantes del día 0, día 6 del ciclo y día 6 con atresia temprana; la expresión de este receptor fue mucho más abundante (casi del doble) que la de los receptores de membrana. También el patrón de expresión de este receptor fue muy diferente al de los receptores de membrana ya que sVEGF-R1, aumentó en forma significativa en los folículos del día 6 en estado de atresia temprana en comparación con los folículos del día 6 del ciclo; este hecho puede indicar que este receptor en los folículos, que muy probablemente estén atrésicos, puede estar uniéndose a VEGF evitando que este ligando cumpla con su función angiogénica, razón por la cual pudo haberse producido la atresia. Los folículos del grupo de estro mostraron la mayor expresión del RNAm de sVEGF-R1, lo cual podría deberse a que el folículo dominante del día del estro, se prepara para la ovulación disminuyendo de forma transitoria la disponibilidad de VEGF para evitar una exagerada producción de nuevos vasos sanguíneos que al ocurrir la eclosión del folículo pudieran poner en riesgo la integridad no solo del ovario, sino del animal. Hazzard *et al.* (2002) notó que la administración intrafolicular de sVEGF-R1 en el folículo preovulatorio inhibe las acciones de VEGF en el folículo preovulatorio alterando la ovulación y reduciendo la formación del cuerpo lúteo en mono rhesus. Resultados similares fueron reportados por Xu *et al.* (2005) en folículos preovulatorios de mono rhesus, ya que observaron que en los animales tratados con altas dosis de sVEGF-R1 se retrasa ó inhibe la ovulación y la formación y desarrollo del cuerpo lúteo.

XI. CONCLUSIONES

En esta trabajo se presentó la expresión de RNAm de las isoformas VEGF-120, VEGF-164, y de sus receptores VEGF-R1, VEGF-R2 y sVEGF-R1 en folículos dominantes de bovino.

El análisis de las isoformas de VEGF no demostró diferencias significativas de la expresión de RNAm de VEGF-120 en los distintos estados fisiológicos del folículo dominantes. La isoforma con mayor expresión debido a los cambios observados por el tratamiento es VEGF-164. Estos cambios por tratamiento pueden deberse a los oligos utilizados para esta isoforma, ya que incluye tanto los de carácter angiogénico como los antiangiogénicos, y que el tratamiento haga que se exprese VEGF-164b.

La expresión de RNA de VEGF-R1 y VEGF-R2 bajo una misma situación fisiológica tuvo un patrón similar en los tres estados fisiológicos. En ambos casos en el grupo de estro se observó una disminución de la expresión de ambos RNAm.

Se demostró por primera vez la expresión de RNAm del receptor sVEGF-R1 en folículos dominantes de bovino bajo condiciones *in vivo*, lo que parece tener actividad biológica, ya que en este trabajo se encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos. La elevada expresión de RNAm de sVEGF-R1 podría deberse a la modulación biológica de los receptores de membrana, evitando así una exagerada producción de vasos sanguíneos.

X. LITERATURA CITADA

Acosta TJ, Hayashi KG, Ohtani M, Miyamoto A. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction*. 2003; 125:759–767

Adams GP. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *Journal of Reproduction and Fertility supplement*. 1999; 54:17-32.

Alonso-Pozosl, Rosales-TorresAM, Ávalos-Rodríguez A, Vergara-Onofre M, Rosado-García A. Mechanism of granulosa cell death during follicular atresia depends on follicular size. *Theriogenology*. 2003; 60:1071–1081.

Arai K, Watanabe G, Taya K, Sasamoto S. Roles of Inhibin and Estradiol in the Regulation of Follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone Secretion during the Estrous Cycle of the Rat. *Biology of Reproduction*. 1996; 55: 127-133.

Armstrong D, and Webb R. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Reviews of Reproduction*. 1997;2:139–146.

BaoB, and Garverick HA. Expression of Steroidogenic Enzyme and Gonadotropin Receptor Genes in Bovine Follicles During Ovarian Follicular Waves: A Review. *J. Anim. Sci.* 1998; 76: 1903-1921.

Barboni B, Turriani M, Galeati G, Spinaci M, Bacci ML, Forni M and MattioliM. Vascular Endothelial Growth Factor Production in Growing Pig Antral Follicles. *Biology of Reproduction*. 2000;63:858–864.

Beg MA, Bergfelt DR, Kot K and Ginther OJ. Follicle Selection in Cattle: Dynamics of Follicular Fluid Factors During Development of Follicle Dominance. *Biology of Reproduction*. 2002; 66:120-126.

Berisha B, Schams D, Kosmann M, Amselgruber W and Einspanier R. Expression and localization of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. *Journal of Endocrinology*. 2000a; 167:371-382.

Berisha B, Schams D, Kosmann M, Amselgruber W and Einspanier R. Expression and Tissue Concentration of Vascular Endothelial Growth Factor, Its Receptors, and Localization in the Bovine Corpus Luteum During Estrous Cycle and Pregnancy. *Biology of Reproduction*. 2000b; 63:1106-1114.

Berisha B, Steffl M, Welter H, Kleim H, Meyer H, Schams D and Amselgruber W. Effect of the luteinising hormone surge on regulation of vascular endothelial growth factor and extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors in bovine follicles. *Reproduction, Fertility and Development*. 2008; 20:258-268.

Bianco F, Basini G, Santini S and Grasselli F. Angiogenic activity of swine granulosa cells: effects of hypoxia and the role of VEGF. *Veterinary Research Communications*. 2005; 29:157-159.

Bleach CLE, Glencross GR, Feist AS, Groome PN and Knight GP. Plasma Inhibin A in Heifers: Relationship with Follicle Dynamics, Gonadotropins, and Steroids During the Estrous Cycle and after Treatment with Bovine Follicular Fluid. *Biology of Reproduction*. 2001; 64:743-752.

Blondin P, Dufour M and Sirard MA. Analysis of Atresia in Bovine Follicles Using Different Methods: Flow Cytometry, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, and Classic Histology. *Biology of Reproduction*. 1996; 54:631-637.

Boone DL and Tsang BK. Caspase-3 in the Rat Ovary: Localization and Possible Role in Follicular Atresia and Luteal Regression. *Biology of Reproduction*. 1998; 58:1533-1539.

Boonyaparakob U, Gadsby JE, Hedgpeth V, Routh P and Almond GW. Expression and localization of vascular endothelial growth factor and its receptors in pig corpora lutea during the oestrous cycle. *Reproduction*. 2003; 126: 393-405.

Braw-Tal R. The initiation of follicle growth: the oocyte or the somatic cells? *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2002; 187:11-18.

Burns DS, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Knight PG and Ireland JJ. Numbers of Antral Follicles During Follicular Waves in Cattle: Evidence for High Variation Among Animals, Very High Repeatability in Individuals, and an Inverse Association with Serum Follicle-Stimulating Hormone Concentrations. *Biology of Reproduction*. 2005; 73:54-62.

Chowdhury MWH, Scaramuzzi RJ, Wheeler-Jones CPD, Khalid M. The expression of angiogenic growth factors and their receptors in ovarian follicles throughout the estrous cycle in the ewe. *Theriogenology*. 2009; 73: 856-872.

Christenson LK and Stouffer RL. Follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone/ Chorionic Gonadotropin Stimulation of Vascular Endothelial Growth Factor Production by Macaque Granulosa Cells from Pre- and Periovarian Follicles. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1997; 82: 2135-2142

Chun SY, Eisenhauer KM, Minami S, Billing H, Perlas E and Hsueh AJW. Hormonal Regulation of Apoptosis in Early Antral Follicles: Follicle-Stimulating Hormone as a Major Survival Factor. *Endocrinology*. 1996; 137:1447-1456.

Clauss M, Weich H, Breier G, Knies U, Röckl W, Waltenberger J and Risau W. The Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Flt-1 Mediates Biological Activities. *The journal of biological chemistry*. 1996; 271: 17629-17634.

Cui T, Foster R, Saleem M, Mathieson P, Gillatt D, Bates O and Harper S. Differentiated human podocytes endogenously express an inhibitory isoform of vascular endothelial growth factor (VEGF165b) mRNA and protein. *American Journal of Physiology Renal Physiology*. 2004; 286: F767-F773.

Danforth DR, Arbogast LK, Ghosh S, Dickerman A, Rofagha R and Friedman CI. Vascular endothelial growth factor stimulates preantral follicle growth in the rat ovary. *Biology of Reproduction*. 2003;68:1736-1741.

De Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N and Williams LT. The fms-Like Tyrosine Kinase, a Receptor for Vascular Endothelial Growth Factor. *Science*. 1992; 246:989-991.

Doyle LK, Walker FX and Donadeu FX. VEGF modulates the effects of gonadotropins in granulosa cells. *Domestic Animal Endocrinology*. 2009; 38 (3): 127-137.

Einspaner R, Schönfelder M, Müller K, Stojkovic M, Kosman WE and Schams D. Expression of the vascular endothelial growth factor and its receptors and effects of VEGF during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes (COC). *Molecular reproduction and development*. 2002; 62:29-36.

Evans ACO and Fortune JE. Selection of the Dominant Follicle in Cattle Occurs in the Absence of Differences in the Expression of Messenger Ribonucleic Acid for Gonadotropin Receptors. *Endocrinology*. 1997;138:2963-2971.

Evans ACO. Characteristics of Ovarian Follicle Development in Domestic Animals. *Reproduction Domestic Animal*. 1997; 38:240-246.

Evans ACO, Ireland JLH, Winn ME, Lonergan P, Smith GW, Coussens PM and Ireland JJ. Identification of Genes Involved in Apoptosis and Dominant Follicle Development During Follicular Waves in Cattle. *Biology of Reproduction*. 2004; 70:1475-1484.

Ferrara N, Houck K, Jakeman L and Leung DW. Molecular and Biological Properties of the Vascular Endothelial Growth Factor Family of Proteins. *Endocrine Reviews*. 1992; 13:18-32

Ferrara N and Davis-Smyth T. The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor. *Endocrine Reviews*. 1997; 18:4-25

Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney International*. 1999; 56:794-814.

Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *American Journal of Physiology Cellular Physiology*. 2001; 280:1358-1366.

Ferrara N, Frantz G, LeCouter J, Dillard-Telm L, Pham T, Draksharapu A, Giordano T and Peale F. Differential Expression of the Angiogenic Factor Genes Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Endocrine Gland-Derived VEGF in Normal and Polycystic Human Ovaries. *American Journal of Pathology*. 2003; 162:1881-1893.

Flores-Pérez F, Rosas-Velasco C, Romano-Pardo M y Pérez-Martínez M. Apoptosis y atresia folicular: un binomio en el desarrollo ovárico. *Veterinaria México*. 2005; 36(1):87-103

FoghiA, Ravandi A, Teerds KJ, Van Der Donk H, Kuksis A and Dorrington J. Fas-Induced Apoptosis in Rat Thecal/Interstitial Cells Signals Through Sphingomyelin-Ceramide Pathway. *Endocrinology*. 1998a; 139:2041-2047.

Foghi A, Teerds, KJ, Van Der Donk H, Moore NC and DorringtonJ. Induction of apoptosis in thecal/interstitial cells: action of transforming growth factor (TGF) alpha plus TGF β on bcl-2 and interleukin-1 β -converting enzyme. *Journal of Endocrinology*. 1998b; 157:489-494.

Fortune JE. Ovarian Follicular Growth and Development in Mammals. *Biology of Reproduction*. 1994; 50:225-232.

Fortune JE, Rivera GM, Evans ACO and Turzillo AM. Differentiation of Dominant Versus Subordinate Follicles in Cattle. *Biology of Reproduction*. 2001; 65:648-654.

Fortune JE. (2003). The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci*. Oct 15; 78(3-4):135-63.

García A, Hernández J y Valencia J. Efecto de la administración de líquido folicular equino libre de esteroides durante la fase lútea sobre la tasa de ovulación en ovejas Rambouillet. *Veterinaria México*. 2001; 32(1).

Ginther OJ, Bergfelt DR, Beg MA and Kot K. Effect of LH on circulating oestradiol and follicular fluid factor concentrations during follicle deviation in cattle. *Reproduction*. 2001a; 122:103-110.

Ginther OJ, Beg MA, Bergfelt DR, Donadeu FX and Kot K. Follicle Selection in Monovular Species. *Biology of Reproduction*. 2001b; 65:638-647.

Gómez R, Simón C, Remohí J and Pellicer A. Administration of moderate and high doses of gonadotropins of female rats increases ovarian vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor-2 expression that is associated to vascular hiperpermeability. *Biology of reproduction*. 2003; 68:2164-2171.

Gómez R, Lima I, Simón C and Pellicer A. Administration of low-dose LH induces ovulation and prevents vascular hyperpermeability and vascular

endothelial growth factor expression in superovulated rats. *Reproduction*. 2004; 127: 483-489.

Grazul-Bilska AT, Navanukraw C, Johnson ML, Vonnahme KA, Ford SP, Reynolds LP and Redmer DA. Vascularity and expression of angiogenic factors in bovine dominant follicles of the first follicular wave. *Journal of Animal Science*. 2007; 85: 1914-1922.

Greenaway J, Connor K, Pedersen H, Coomber B, Lamarre J and Petrik J. Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptor, Flk-1/KDR, Are Cytoprotective in the Extravascular Compartment of the Ovarian Follicle. *Endocrinology*. 2004; 145(6): 2896-2905.

Greenaway J, Gentry PA, Feige JJ, LaMarre J and Petrik J. Thrombospondin and Vascular Endothelial Growth Factor Are Cyclically Expressed in an Inverse Pattern During Bovine Ovarian Follicle Development. *Biology of Reproduction*. 2005; 72:1071-1078.

Gruemmer R, Motejlek K, Berghaus D, Weich H and Neulen J. Regulation of soluble vascular endothelial growth factor receptor (sFlt-1/sVEGFR-1) expression and release in endothelial cells by human follicular fluid and granulosa cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2005;3(57): 1-7.

Hampton JH, Bader JF, Lamberson WR, Smith MF, Youngquist RS and Garverick HA. Gonadotropin requirements for dominant follicle selection in GnRH agonist-treated cows. *Reproduction*. 2004; 127: 695-703.

Harper SJ and Bates DO. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nature Reviews*. 2008: 880-887.

Hastings JM, Licence DR, Burton GJ, Charnock-Jones DE and Smith, SK. Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 Inhibits Edema and Epithelial Proliferation Induced by 17 β -Estradiol in the Mouse Uterus. *Endocrinology*. 2003; 144:326-334.

Hazzard TM, Molskness TA, Chaffin CL and Stouffer RL. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Angiopoietin Regulation by Gonadotrophin and Steroids in Macaque Granulosa Cell During the Peri-Ovulatory Interval. *Molecular Human Reproduction*. 1999; 5(12):1115-1121.

Hazzard TM, Xu F and Stouffer RL. Injection of Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 into the Preovulatory Follicle Disrupts Ovulation and Subsequent Luteal Function in Rhesus Monkeys. *Biology of Reproduction*. 2002;67:1305-1312.

Hendriksen PJM, Gadella BM, Vos PLAM, Mullaart E, Kruijff TAM and Dieleman SJ. Follicular Dynamics Around the Recruitment of the First Follicular Wave in the Cow. *Biology of Reproduction*. 2003;69: 2036-2044.

Hernández CJ, Murcia MC, Valencia MJ, Rojas MS, Zárate MJ, Zarco QL. Efecto del líquido folicular equino libre de esteroides sobre la secreción de FSH en ovejas en anestro estacional y la presentación del estro inducido con PGf2 α en ovejas ciclando. *Veterinaria México*. 1997; 28: 117-121.

Hernández CJ, Zarco QL, Kindahl H, Valencia MJ. Desarrollo folicular, concentraciones de FSH, estradiol y MPGF α asociado con persistencia lútea por la administración de líquido folicular equino libre de esteroides en la oveja. *Veterinaria México*. 2004; 35 (1).

Hornig C and Weich HA. Soluble VEGF receptors Recombinant and naturally occurring forms involved in the regulation of angiogenesis. *Angiogenesis*. 1999; 3:33-39.

Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Molecular Endocrinology*. 1991; 5(12):1806-14.

Hsueh JWA, Billig H and Tsafiriri A. Ovarian Follicle Atresia: A Hormonally Controlled Apoptotic Process. *Endocrine Reviews*. 1994; 15 (6): 707-724.

Hünigen H, Bisplinghoff P, Plendl J, and Bahramsoltani M. Vascular dynamics in relation to immunolocalisation of VEGF-A, VEGFR-2 and Ang-2 in the bovine corpus luteum. *Acta histochemica*. 2008; 110: 462-472.

Ireland JJ and Roche JF. Growth and differentiation of large antral follicles after spontaneous luteolysis in heifers: changes in concentration of hormones in follicular fluid and specific binding of gonadotropins to follicles. *Journal of Animal Science*. 1983; 57(1):157-167.

Ireland JJ, Mihn M, Austin E, Diskin MG and Roche JF. Historical Perspective of Turnover of Dominant Follicles During the Bovine Estrous Cycle: Key Concepts, Studies, Advancements, and Terms. *Journal of Dairy Science*. 2000; 83:1648-1658.

Kaczmarek M, Schams D and Ziecik A. **Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology – an overview.** *Biology Reproductive*. 2005; 5(2): 111-136.

Kaczmarek M, Kowalczyk A, Waclawik A, Schams D and Ziecik A. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the porcine corpus luteum during the estrous cycle and early pregnancy. *Molecular Reproduction and Development*. 2007; 74: 730-739.

Kaczmarek M, Kiewisz J, Schams D and Ziecik AJ. Expression of VEGF-receptor system in conceptus during peri-implantation period and endometrial and

luteal expression of soluble VEGFR-1 in the pig. *Theriogenology*. 2009; 71:1298-1306.

Kamat BR, Brown LF, Manseau EJ, Senger DR and Dvorak HF. Expression of Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor by Human Granulosa and Theca Lutein Cells, Role in Corpus Luteum Development. *American Journal of Pathology*. 1995; 146(1): 157-165.

Kawano Y, Hasan KZ, Fukuda J, Mine S, Miyakawa I. Production of vascular endothelial growth factor and angiogenic factor in human follicular fluid. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2003; 202:19-23.

Kendall R and Thomas K. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proceedings of the National Academy Sciences*. 1993; 90:10705-10709.

Kendall R, Wang G and Kenneth AT. Identification of a Natural Soluble Form of the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor, FLT-1, and Its Heterodimerization with KDR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1996; 226: 324-328.

Koos RD. Increased Expression of Vascular Endothelial Growth/Permeability Factor in the Rat Ovary Following an Ovulatory Gonadotropin Stimulus: Potential Roles in Follicle Rupture. *Biology of Reproduction*. 1995; 52:1426-1435.

Kosaka N, Sudo N, Miyamoto A and Shimizu T. Vascular endothelial growth factor (VEGF) suppresses ovarian granulosa cell apoptosis in Vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007; 363: 733-737.

Kowanetz M and Ferrara N. Vascular Endothelial Growth Factor Signaling Pathways: Therapeutic Perspective. *Clinical Cancer Research*. 2006; 12(17): 5018-5022.

Krussel J, Casan E, Raga F, Hirchenhain J, Wen Y, Huang HY, Bielfiel P and Polan M. Expression of RNA for vascular endothelial growth factor transmembranous receptor Flt-1 and KDR, and the soluble receptor sflt in cycling human endometrium. *Molecular human reproduction*. 1999; 5 (5): 452-458.

Lee DW, Grasso P, Dattatreya B, Deziel MR and Reichert LE Jr. Purification of a High Molecular Weight Follicle-Stimulating Hormone Receptor-Binding Inhibitor Human Follicular Fluid. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1993; 77 (1): 163-168.

Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV and Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 1992; 246: 1306-1309.

Lijima K, Jiang JY, Shimizu T, Sasada H and Sato E. Acceleration of follicular development by administration of vascular endothelial growth factor in cycling female rats. *Journal of Reproduction and Development*. 2005; 51 (1): 161-168.

Lucy MC, Savio JD, Badinga L, De La Sota RL and Thatchers WW. Factors That Affect Ovarian Follicular Dynamics in Cattle. *Journal of Animal Science*. 1992; 70:3615-3626.

Mattioli M, Barboni B, Turriani M, Galeati G, Zannoni A, Castellani G, Berardinelli P and Scapolo PA. Follicle Activation Involves Vascular Endothelial Growth Factor Production and Increased Blood Vessel Extension. *Biology of Reproduction*. 2001;65:1014-1019.

McCormack JT, Friederichs MG, Limback SD and Greenwald GS. Apoptosis during Spontaneous Luteolysis in the Cyclic Golden Hamster: Biochemical and Morphological Evidence. *Biology of Reproduction*. 1998;58: 255-260.

McGee EA and Hsueh AJ. Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles. *Endocrine Reviews*. 2000; 21(2): 200-214.

McNatty KP, Heath DA, Lundy T, Fidler AE, Quirke L, O'Connell A, Smith P, Groome N and Tisdall DJ. Control of early ovarian follicular development. *Journal of Reproduction and Fertility supplement*. 1999; 54:3-16.

Melvin EJ, Lindsey BR, Quintal-Franco J, Zanella E, Fike KE, Van Tassell CP and Kinder JE. Circulating Concentrations of Estradiol, Luteinizing Hormone, and Follicle-Stimulating Hormone during Waves of Ovarian Follicular Development in Prepubertal Cattle. *Biology of Reproduction*. 1999; 60:405-412.

Mihm M, Good TEM, Ireland JLH, Ireland JJ, Knight PG and Roche JF. Decline in Serum Follicle-Stimulating Hormone Concentrations Alters Key Intrafollicular Growth Factors Involved in Selection of the Dominant Follicle in Heifers. *Biology of Reproduction*. 1997;57:1328-1337.

Mihm M, Baker PJ, Ireland JLH, Smith GW, Coussens PM, Evans ACO and Ireland JJ. Molecular Evidence That Growth of Dominant Follicles Involves a Reduction in Follicle-Stimulating Hormone Dependence and an Increase in Luteinizing Hormone Dependence in Cattle. *Biology of Reproduction*. 2006; 74:1051-1059.

Moser MT, Garverick HA, Smith MF and Youngquist RS. Effect of bovine follicular fluid and follicle-stimulating hormone on follicular growth in unilaterally ovariectomized prepubertal heifers. *Journal of Dairy Science*. 1989; 72:2170-2178.

Navindranath N, Little-Ihrig L, Phillips HS, Ferrara N and Zeleznik AJ. Vascular endothelial growth factor Messenger ribonucleic acid expression in the primate ovary. *Endocrinology*. 1992; 131: 254-260.

Neagoe PE, Lemieux C and Sirois MG. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-A165-induced Prostacyclin Synthesis Requires the Activation of VEGF Receptor-1 and -2 Heterodimer. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280(11): 9904-9912.

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S and Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB Journal*. 1999; 13:9-22.

Neulen J, Raczek S, Pogorzelski M, Grunwald K, Yeo TK, Dvorak HF, Weich HA and Breckwoldt M. Secretion of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor from human luteinized granulosa cells is human chorionic gonadotropin dependent. *Molecular Human Reproduction*. 1998; 4(3): 203-206.

Ng YS, Krilleke D and Shima DT. VEGF function in vascular pathogenesis. *Experimental Cell Research*. 2006; 312:527-537.

Nilsson E and Skinner K. Cellular Interactions That Control Primordial Follicle Development and Folliculogenesis. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2001; 8:S17-S20.

Nowak D, Woolard J, Mohamed E, Konopatskaya O, Saleem M, Churchill A, Ladomery M, Harper S And Bates D. Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors. *Journal of Cell Science*. 2008; 5:3487-3495.

Papa PC, Moura CEB, Artoni LP, Fatima LA, Campos DB, Marques JEB, Baruselli PS, Binelli M, Pfarrer C, Leiser R. VEGF system expression in different stages of estrous cycle in the corpus luteum of non-treated and superovulated water buffalo. *Domestic Animal Endocrinology*. 2007; 33:379-389.

Parker KI, Robertson DM, Groome NP and Macmillan KL. Plasma Concentrations of Inhibin A and Follicle-Stimulating Hormone Differ Between Cows with Two or Three Waves of Ovarian Follicular Development in a Single Estrous Cycle. *Biology of Reproduction*. 2003; 68:822-828.

Parrott JA and Skinner MK. Kit-Ligand/Stem Cell Factor Induces Primordial Follicle Development and Initiates Folliculogenesis. *Endocrinology*. 1999; 140(9): 4262-4271.

Phillips HS, Hains J, Leung DW and Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is expressed in rat corpus luteum. *Endocrinology*. 1990; 127(2): 965-7.

Picton H, Briggs D and Gosden R. The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular Cell Endocrinology*. 1998; 25:27-37.

Quintana R, Kopcow L, Marconi G, Sueldo C, Speranza G and Barañao RI. Relationship of ovarian stimulation response with vascular endothelial growth factor and degree of granulosa cell apoptosis. *Human Reproduction*. 2001; 16(9): 1814-1818.

Quintana R, Kopcow L, Sueldo C, Marconi G, Rueda N and Barañao R. Direct injection of vascular endothelial growth factor into the ovary of mice promotes

follicular development. *Fertility and Sterility*. 2004; 82:1101-1105.

Quirk SM, Cowan RG, Harman RM, Hu CL and Porter DA. Ovarian follicular growth and atresia: The relationship between cell proliferation and survival. *Journal of Animal Science*. 2004; 82:40-52.

Redmer D and Reynolds L. Angiogenesis in the ovary. *Reviews of Reproduction*. 1996; 1:182-192.

Redmer DA, Dai Y, Li J, Charnock-Jones DS, Smith SK, Reynolds LP and Moor RM. Characterization and expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the ovine corpus luteum. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1996; 108:157-165.

Reynolds LP and Redmer DA. Expression of the Angiogenic Factors, Basic Fibroblast Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor, in the Ovary. *Journal of Animal Science*. 1998; 76:1671-1681.

Reynolds LP and Redmer DA. Growth and development of the corpus luteum. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*. 1999; 54: 181-191.

Roberts A, Arbogast L, Friedman Ch, Cohn D, Kaumaya P and Danforth D. Neutralization of Endogenous Vascular Endothelial Growth Factor Depletes Primordial Follicles in the Mouse Ovary. *Biology of Reproduction*. 2007; 76:218-223.

Robinson CJ and Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *Journal of Cell Science*. 2001; 114(5): 853-865.

Robinson RS, Nicklin LT, Hammond AJ, Schams D, Hunter MG and Mann GE. Fibroblast Growth Factor 2 Is More Dynamic than Vascular Endothelial Growth Factor A During the Follicle-Luteal Transition in the Cow. *Biology of Reproduction*. 2007; 77:28-36.

Robinson RS, Woad KJ, Hammond AJ, Laird M, Hunter MG and Mann GE. Angiogenesis and vascular function in the ovary. *Reproduction*. 2009; 138:869-891.

Rosales-Torres AM, Avalos-Rodriguez A, Vergara-Onofre M, Hernandez-Perez O, Ballesteros LM, Garcia-Macedo R, Ortiz-Navarrete V y Rosado A. Multiparametric study of atresia in ewe antral follicles: Histology, flow cytometry, internucleosomal DNA fragmentation, and lysosomal enzyme activities in granulosa cells and follicular fluid. *Molecular Reproduction and Development*. 2000; 55(3): 270-281.

Rosales TAM y Guzmán SA. Apoptosis en la atresia folicular y la regresión del cuerpo lúteo. *Revisión. Técnica Pecuaria México*. 2008; 46(2):159-182.

Russe I. Oogenesis in cattle and sheep. *Biblioteca Anatomicall.* 1983; 24:77-92.

Sela S, Itin A, Natanson-Yaron S, Greenfield C, Goldman-Wohl D, Yagel S and Keshet E. A Novel Human-Specific Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1: Cell Type-Specific Splicing and Implications to Vascular Endothelial Growth Factor Homeostasis and Preeclampsia. *Circulation Research.*2008; 102:1566-1574.

Shimizu T, Jiang JY, Sasada H and Sato E. Changes of Messenger RNA Expression of Angiogenic Factors and Related Receptors During Follicular Development in Gilts. *Biology of Reproduction* 2002; 67:1846-1852.

Shimizu T, Kawahara M, Abe Y, Yokoo M, Sasada H and Sato E. Follicular Microvasculature and Angiogenic Factors in the Ovaries of Domestic Animals. *Journal of Reproduction and Development.* 2003a; 49(3):181-192.

Shimizu T, Jiang JY, Lijima K, Miyabayashi K, Ogawa Y, Sasada H and Sato E. Induction of follicular development by direct single injection of vascular endothelial growth factor gene fragments into the ovary of miniature gilts. *Biology of Reproduction.* 2003b; 69:1388-1393.

Shimizu T and Miyamoto A. Progesterone induces the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) 120 and Flk-1, its receptor, in bovine granulosa cells. *Animal Reproduction Science.* 2007; 102(3-4):228-237.

Shimizu T, Jayawardana B, Tetsuka M and Miyamoto A. Differential effect of Follicle-Stimulating Hormone and estradiol on Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) 120, VEGF164 and their Receptors in Bovine Granulosa Cells. *Journal of Reproduction and Development.* 2007a; 53(1): 105-112.

Shimizu T, Lijima K, Miyabayashi K, Ogawa Y, Miyazaki H, Sasada H and Sato E. Effect of direct ovarian injection of vascular endothelial growth factor gene fragments on follicular development in immature female rats. *Reproduction.* 2007b; 134:677-682.

Spicer LJ and Echtenkamp SE. Ovarian Follicular Growth, Function and Turnover in Cattle: a Review. *Journal Animal Science.* 1986; 62:428-451.

Stegner JE, Kojima, FN, Bader JF, Lucy MC, Ellersieck MR, Smith MF and Patterson DJ. Follicular dynamics and steroid profiles in cows during and after treatment with progestin-based protocols for synchronization of estrus. *Journal of Animal Science.*2004; 82: 1022-1028.

Stock AE and Fortune JE. Ovarian Follicular Dominance in Cattle: Relationship between Prolonged Growth of the Ovulatory Follicle and Endocrine Parameters. *Endocrinology.* 1993; 132(3): 1108-1114.

Sugino N, Kashida S, Takiguchi S, Karube A and Kato H. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptors in the Human Corpus Luteum during the Menstrual Cycle and in Early Pregnancy. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2000; 85(10):3919-3924.

Suikkari AM, Söderström-Anttila V. In-vitro maturation of eggs: is it really useful? *Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*. 2007; 21(1): 145-55.

Taylor C and Rajamahendran R. Follicular Dynamics and Corpus Luteum Growth and Function in Pregnant Versus Nonpregnant Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*. 1991; 74:115-123.

Taylor PD, Hillier SG and Fraser HM. Effects of GnRH antagonist treatment on follicular development and angiogenesis in the primate ovary. *Journal of Endocrinology*. 2004; 183:1-17.

Taylor PD, Wilson H, Hillier SG, Wiegand SJ and Fraser HM. Effects of inhibition of vascular endothelial growth factor at time of selection on follicular angiogenesis, expansion, development and atresia in the marmoset. *Molecular Human Reproduction*. 2007; 13(10):729-736.

Tilly JL. Apoptosis and ovarian function. *Reviews of Reproduction*. 1996; 1:162-172.

Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, Distante V, Pazzagli M, Bustin SA and Orlando C. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Analytical Biochemistry*. 2002; 309(2):293-300.

Trousdale R, Poliak S, Klein J, Lobel L, Funhashi Y, Feirt N and Lustbader J. Single-Chain Bifunctional Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Follicle-Stimulating Hormone (FSH)-C-Terminal Peptide (CTP) Is Superior to the Combination Therapy of Recombinant VEGF plus FSH-CTP in Stimulating Angiogenesis during Ovarian Folliculogenesis. *Endocrinology*. 2007; 148(3):1296-1305.

Voelkel NF and Tuder RM. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: a model for what human disease? *The Journal of Clinical Investigation*. 2000; 106:733-738.

Wang JL, Feng L, Jean J, Chen PK, Liu P and Zheng W. VEGF expression and enhanced production by gonadotropins in ovarian epithelial tumors. *International Journal of Cancer*. 2002; 97:163-167.

Webb R, Cambell BK, Garverick HA, Gong JG, Gutierrez CG and Armstrong DG. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. *Journal of Reproduction and Fertility supplement*. 1999; 54:33-48.

Woolard J, Wang WY, Bevan HS, Qiu Y, Morbidelli L, Pritchard-Jones RO, Cui TG, Sugiono M, Waine E, Perrin R, Foster R, Digby-Bell J, Shields JD, Whittles CE, Mushens RE, Gillatt DA, Ziche M, Harper S and Bates DO. VEGF165b, an Inhibitory Vascular Endothelial Growth Factor Splice Variant: Mechanism of Action, *In vivo* Effect On Angiogenesis and Endogenous Protein Expression. *Cancer Research*. 2004; 64: 7822-7835.

Wulff C, Wilson H, Lague P, Duncan WC, Armstrong DG and Fraser HM. Angiogenesis in the Human Corpus Luteum: Localization and Changes in Angiopoietins, Tie-2, and Vascular Endothelial Growth Factor Messenger Ribonucleic Acid. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2000; 85(11):4302-4309.

Wulff C, Wiegand SJ, Saunders PTK, Scobie GA and Fraser HM. Angiogenesis during follicular development in the primate and its inhibition by treatment with truncated Flt-1-Fc (Vascular Endothelial Growth Factor Trap_{A40}). *Endocrinology*, 2001; 42:3244-3254.

Xu F, Hazzard, T, Evans A, Charnock-Jones S, Smith S, Stouffer R. Intraovarian actions of anti-angiogenic agents disrupt periovulatory events during the menstrual cycle in monkeys. *Contraception*. 2005; 71: 239-248.

Yang MY and Fortune JE. Vascular Endothelial Growth Factor stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles in Vitro. *Molecular Reproduction and Development*. 2007; 74: 1095-1104.

Yulong H, Smith S, Day KA, Clark DE, Licence DR and Charnock-Jones S. Alternative Splicing of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-R1 (FLT-1) pre-mRNA Is Important for the Regulation of VEGF Activity. *Molecular Endocrinology*. 1999; 13(4):537-545.

Zimmerman R, Xiao E, Husami N, Sauer M, Lobo R, Kitajewski J and Ferin M. Short-term administration of antivascular endothelial growth factor antibody in the late follicular phase delays follicular development in the rhesus monkey. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2001; 86(2): 768-772.

Zygalaki E, Stathopoulou A, Kroupis Ch, Kaklamanis L, Kyriakides Z, Kremastinos D and Lianidou E. Real-Time Reverse Transcription-PCR Quantification of Vascular Endothelial Growth Factor Splice Variants. *Clinical Chemistry*. 2005;51(8): 1518-1520.