



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

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

**IDENTIFICACIÓN DE LAS ISOFORMAS SOLUBLES DE
LOS RECEPTORES 1 Y 2 PARA EL FACTOR DE
CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR EN
CÉLULAS DE FOLÍCULOS DOMINANTES**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

RICARDO MACIAS VALENCIA

TUTORES:

CARLOS GUILLERMO GUTIÉRREZ AGUILAR

ANA MARIA ROSALES TORRES

COMITÉ TUTORAL:

FRANCISCO FIERRO FIERRO

MÉXICO D.F.

2011.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

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 **229843**.

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. Ricardo Macias Valencia

Honorable Jurado de Examen

Presidente.

Dr. Miguel Ángel Cornejo Cortes

Secretario.

Dra. Ana María Rosales Torres

Vocal.

Dra. Marta Romano Pardo

Suplente.

Dra. Lucia Eliana Rangel Porta

Suplente.

Dr. Rogelio A. Alonso Morales

DEDICATORIAS

A Dios porque siempre me ha acompañado en el largo camino de mi vida y por haberme cuidado en cada momento “Gracias Señor”.

A Kenya Salazar Mejía y Paula Macias Salazar por ser lo más grande que me ha dado la vida por ser el motor en el día a día, por apoyarme en esta aventura que no fue nada fácil pero lo logramos amor, lo logramos gracias, porque son y están conmigo y por darme todo lo que me dan las amo.

Al siempre incondicional apoyo de mi familia principalmente de mis padres, José Refugio Macias Chávez y Rosa Amalia Valencia Manríquez, por darme lo mejor de su cariño, comprensión y gracias a su gran ejemplo durante todos estos años; de igual forma para mis hermanos Víctor Manuel Macias Valencia, Joel Macias Valencia, Jonathan Samuel Macias Valencia, Diego Isaías Macias Valencia (Tetis) y María Fernanda Macias Valencia por soportar mi mal carácter y estar siempre conmigo en los momentos más difíciles de mi vida gracias a todos ustedes.

A la memoria de mi Abuelita Josefina Manríquez Pérez que dedico su vida a cuidarnos y llenarnos de cariño sin lugar a duda una gran mujer y que aunque ya no está físicamente, nos sigue cuidando como siempre.

A Rubén Valencia Manríquez por enseñarme a ser un hombre responsable y por el gran ejemplo que nos has dado

A la Dra. Ana María Rosales Torres por darme la oportunidad de formar parte de su equipo y brindarme todos sus conocimientos y por haber contribuido en mi formación académica enseñándome todo lo que sabe, gracias por creer en mí.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Bioquímica de la Reproducción por acompañarme en esta aventura, en especial a la Dra. Marcela Vergara Onofre y a Minerva Carolina Torres Ortiz .

Al Dr. Carlos Guillermo Gutiérrez por su apoyo brindado durante mi formación académica.

Al Dr. Francisco Fierro Fierro por todo el tiempo que me ayudo y lo mucho que me enseñó.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ana María Rosales Torres por su incansable dedicación a formar alumnos de calidad y por el apoyo durante la realización de esta Maestría.

Al Dr. Carlos Guillermo Gutiérrez Aguilar por sus comentarios en mi formación.

Al Dr. Francisco Fierro Fierro por el apoyo y la ayuda en la parte experimental de la tesis, así como sus siempre tan acertados comentarios.

Al CONACYT por la beca otorgada ya que con ese apoyo pude ser alumno de tiempo completo como lo establece el programa de maestría y concluir mis estudios

RESUMEN

La adquisición de un adecuado aporte vascular es un paso limitante en la selección y maduración de los folículos. El Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF), es un potente mitógeno de células endoteliales, producido por las células de la granulosa y teca. La actividad de este factor, está regulada por dos receptores tipo tirosina cinasa (VEGFR-1 y VEGFR-2). Mediante un procesamiento alternativo del extremo 3' del pre-RNA_m se pueden generar también receptores solubles (sVEGFR-1 y sVEGFR-2), que contienen únicamente los dominios extracelulares de las proteínas, los cuales ligan igualmente el factor VEGF. Los objetivos de este trabajo fueron demostrar la existencia del RNA_m de sVEGFR-1 y sVEGFR-2 en células foliculares de bovino, así como conocer si existen diferencias en la expresión del mismo entre folículos dominantes de los días 4, 6 y 9 del ciclo. Se demostró la presencia del RNA_m de sVEGFR-1 y sVEGFR-2 en células de folículos dominantes y se realizó la secuenciación del cDNA de ambos receptores. En ambos casos se observó la transcripción de la parte proximal de la secuencia del intrón 13, característica que se presenta también en humanos y otras especies. Adicionalmente, la abundancia relativa del RNA_m de sVEGFR-1 frente al transcrito del RNA_r 18s difirió entre los tres tiempos estudiados (día 4=1.1262±0.050; día 6=0.9462±0.50 y día 9=0.44075±0.056) (P<0.001). Mientras que para sVEGFR-2, la abundancia relativa fue mayor (P=0.09) en el día 9 (1.826±0.26) que en los días 4 (1.035±0.23) y 6 (1.179±0.233) del ciclo. Los resultados demuestran por primera vez la presencia de los receptores solubles de VEGF en bovinos. Esto permite suponer que las formas solubles de los receptores de VEGFR-1 y VEGFR-2 intervienen en el proceso de angiogenesis en los folículos dominantes.

Palabras clave: Receptores del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular, receptores solubles 1 y 2, sVEGFR-1, sVEGFR-2, folículos dominantes, atresia.

ABSTRACT

The acquisition of an adequate blood supply is a limiting step in the selection and maturation of the follicles. The Endothelial Growth Factor (VEGF), is a potent endothelial cell mitogen produced by granulosa cells and theca. The activity of this factor, is regulated by two tyrosine kinase receptors (VEGFR-1 and VEGFR-2). Through alternative processing the 3' end of pre-mRNA can also generate soluble receptors (sVEGFR-1 and sVEGFR-2), containing only the extracellular domains of proteins, which bind VEGF also the factor. The objectives of this study was to demonstrate the existence of sVEGFR-1 mRNA and sVEGFR-2 in bovine follicular cells and determine whether there are differences in the expression of it between dominant follicles of 4, 6 and 9 of the cycle. It showed the presence of sVEGFR-1 mRNA and sVEGFR-2 cells of dominant follicles and performed cDNA sequencing of both receptors. In both cases showed the transcription of the proximal part of the sequence of intron 13, a feature that is also present in humans and other species. Additionally, the relative abundance of sVEGFR-1 mRNA compared to 18S rRNA transcript differed among the three times studied (day 4 = 1.1262 ± 0.050 , Day 6 = 0.9462 ± 0.50 and ± 0.44075 days 9 = 0.056) ($P < 0.001$). While for sVEGFR-2, the relative abundance was higher ($P = 0.09$) at day 9 (1826 ± 0.26) than on days 4 ($1,035 \pm 0.23$) and 6 (1179 ± 0233) of the cycle. The results demonstrate for the first time the presence of soluble VEGF receptors in cattle. This suggests that the soluble forms of receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 involved in the process of angiogenesis in dominant follicles.

Keywords: Growth Factor Receptors of Vascular Endothelial, soluble receptors 1 and 2, sVEGFR-1, sVEGFR-2, dominant follicle atresia.

INDICE GENERAL	PÁGINA
DEDICATORIAS	VI
AGRADECIMIENTOS	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
1. Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF)	3
1.1. Isoformas de VEGF	5
1.2. Regulación de VEGF	7
2. Funciones de VEGF	8
2.1. Angiogénesis	9
2.2. Citoprotección	10
2.3. Proliferación	11
2.4. Permeabilidad Vascular	11
2.5. Migración	12
3. Receptores de membrana para VEGF: VEGFR-1, VEGFR-2	12
3.1. Isoformas Solubles: sVEGFR-1 y sVEGFR-2	17
3.2. Regulación de los receptores del VEGF	22
VEGFR-1 y VEGFR-2	
3.3. Maduración Alternativo del RNAm de sVEGFR-1 y sVEGFR-2	23

4. Olas de crecimiento folicular	28
4.1 Selección del folículo Dominante	29
5. Atresia folicular	32
6. Evidencias de la participación de VEGF y sus receptores en el desarrollo folicular y la atresia	35
III. Planteamiento del problema	40
IV. HIPÓTESIS	41
V. OBJETIVOS	41
A. Objetivo General	41
B. Objetivos Particulares	41
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	42
Lugar de realización	42
Secuenciación de sVEGFR-1 y sVEGFR-2 y RT-PCR	43
Diseño de oligonucleótidos	43
RT-PCR Semicuantitativa	48
Extracción de RNA de Tejido Parafinado	48
Análisis Estadísticos	50
VII. Resultados	50
VIII. DISCUSIÓN	53
IX. CONCLUSIONES	61
X. REFERENCIAS	62

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS		PÁGINA
Cuadro 1.	Localización de VEGF y sus receptores de membrana y solubles	39
Cuadro 2.	Oligonucleótidos de sVEGFR-1 y sVEGFR-2 utilizados para la secuenciación y la densitometría.	46
Cuadro 3.	Tren de desparafinado	48
Figura 1.	Familia del VEGF y sus receptores.	4
Figura 2.	Isoformas de VEGF angiogénicas y anti-angiogénicas.	7
Figura 3.	El VEGF estimula la supervivencia celular con señales anti-apoptóticas	10
Figura 4:	Señalización celular inducida por VEGF.	17
Figura 5.	Comparación de la estructura de VEGFR-1 y 2 y sVEGFR-1 y 2.	27
Figura 6.	Representación de las células de la teca, granulosa, ovocito, y los receptores que están presentes en células de la teca y granulosa así como las hormonas que producen cada tipo celular.	30
Figura 7.	Diseño experimental	42
Figura 8.	Esquema de inducción de ovulación	43
Figura 9.	Diseño de oligonucleótidos de sVEGFR-1 y sVEGFR-2.	44
Figura 10.	Identificación de sVEGFR-1 y sVEGFR-2 en células de folículo de bovino.	50
Figura 11.	A. Secuencia de DNAc de sVEGFR-1 y 2 en células foliculares. B. Secuencia predicha de amino ácidos del C-terminal de sVEGFR-1 y 2 en bovino, humano y ratón.	51
Figura 12.	Gel de electroforesis de la RT-PCR de sVEGFR-1, sVEGFR-2 y 18s.	52
Figura 13.	A. Abundancia relativa del RNAm del receptor sVEGFR-1 en folículos dominantes del día 4, 6 y 9 del ciclo estral de bovino. B. Abundancia relativa del RNAm de sVEGFR-2 en folículos dominantes del día 4, 6 y 9 del ciclo estral de bovino.	53

IDENTIFICACIÓN DE LAS ISOFORMAS SOLUBLES DE LOS RECEPTORES 1 Y 2 PARA EL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR EN CÉLULAS DE FOLÍCULOS DOMINANTES.

I. INTRODUCCIÓN

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es un potente estimulador de la proliferación y migración de células endoteliales (Berisha *et al.*, 2000; Chaiworapongsa *et al.*, 2010; Rosales-Torres *et al.*, 2010).

Varios autores (Koos1995; Shimizu y Miyamoto, 2007), han demostrado la importante participación de VEGF en la angiogénesis requerida para el desarrollo folicular. La proteína (Danforth *et al.*, 2003; Grasselli *et al.*, 2003) y el RNAm (Fortune, 2004) de VEGF han sido detectados en las células de la granulosa (Greenaway *et al.*, 2004; Zimmerman *et al.*, 2003; Grazul-Bilska *et al.*, 2007) y de la teca (Redmer *et al.*, 2001; Shimizu *et al.*, 2003) de los folículos ováricos de varias especies domésticas, mientras que en los folículos atresicos la expresión de VEGF es reducida (Shimizu *et al.*, 2007a).

En las vacas, el desarrollo folicular es caracterizado por dos o tres oleadas de crecimiento folicular. En cada una de estas oleadas, un grupo de folículos inicia su crecimiento (reclutamiento) pero sólo uno alcanza la dominancia y posiblemente ovule si coincide con la luteolisis (Fortune *et al.*, 2001). Los folículos subordinados y el dominante no ovulado sufren un proceso degenerativo conocido como atresia por el cual son eliminados del ovario (Webb *et al.*, 1999). La participación de VEGF ha sido demostrada en la selección (Shimizu *et al.*, 2007a) y la dominancia folicular (Grazul-Bilska *et al.*, 2007).

Recientemente, también se le ha atribuido un efecto citoprotector a VEGF en células de la granulosa de folículos de bovino (Greenaway *et al.*, 2004). La actividad de VEGF está mediada principalmente por dos receptores tipo tirosina

cinasa, el VEGFR-1 ó Flt-1 (fms-like-tirosina-cinasa) y el VEGFR-2 ó Flk-1 (cinasa fetal hepática-1) o KDR (Kikuchi *et al.*, 2011).

El papel específico que juegan VEGFR-1 y VEGFR-2 en la señalización de VEGF no es del todo claro, algunos autores mencionan que VEGFR-1 actúa como señuelo para VEGF, haciéndolo menos disponible para interactuar con el receptor VEGFR-2 que tiene mayor actividad (Park *et al.*, 1994; Zeng *et al.*, 2001; Kikuchi *et al.*, 2011). VEGF se une con mayor afinidad a VEGFR-1 (De Vries *et al.*, 1992) que a VEGFR-2, sin embargo VEGFR-2 tiene diez veces más capacidad de fosforilar los dominios de tirosina que VEGFR-1, lo cual sugiere que VEGFR-2 tiene una mayor capacidad para la transducción de la señal inducida por VEGF (Zeng *et al.*, 2001; Chaiworapongsa *et al.*, 2010).

El RNAm de los genes que codifican los receptores de VEGF puede generar los receptores completos (VEGFR-1 y VEGFR-2) o una forma soluble (sVEGFR-1 y sVEGFR-2) (Kikuchi *et al.*, 2011). Los receptores solubles son el resultado del corte y empalme alternativo ocurrido en los respectivos pre-RNAm, con lo cual pierden los dominios transmembranales e intracelulares (De Vries *et al.*, 1994; Kaczmarek *et al.*, 2005). Estos receptores se unen a VEGF con la misma afinidad que los receptores completos, pero no desencadenan ninguna respuesta dentro de la célula, por lo que se piensa que tienen actividad antiangiogénica (Kaczmarek *et al.*, 2005).

Con excepción de la cerda, en la que se ha encontrado el RNAm de sVEGFR-1 en cuerpo lúteo y placenta (Kaczmarek *et al.*, 2009; Tripathi *et al.*, 2009), en otros animales de granja se desconoce si se expresan estas formas truncadas ó solubles de VEGFR-1 y VEGFR-2, tanto en ovarios como en otros sistemas celulares.

De acuerdo a las evidencias bibliográficas, es claro que la angiogénesis, y muy probablemente la protección de las células foliculares, en buena medida están a cargo de VEGF y sus receptores (Greenaway *et al.*, 2005), lo cual parece formar un sistema en donde la interacción del ligando con cada uno de los receptores, ocasiona respuestas diferentes (Ferrara, 2004). La demostración

en otros sistemas celulares de la presencia de sVEGFR-1 y sVEGFR-2, además de los receptores de membrana y el ligando, nos permite sugerir que en las células foliculares están presentes los RNAm de estos receptores solubles y que su patrón de expresión se modificará en el folículo, de acuerdo al día del ciclo estral.

II. ANTECEDENTES

1. Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF)

El VEGF también conocido como VPF (factor de permeabilidad vascular) o vasculotropina, es una glicoproteína básica homodimérica de 34-46 kDa, ligada a la heparina por medio de residuos básicos de arginina, manteniéndose así en la membrana basal (Ferrara *et al.*, 2003), que esta formada por polipéptidos con extremo N terminal idénticos, unidos por puentes disulfuro (Harper y Bates, 2008). Este factor es secretado y expresado por múltiples células de origen humano y animal (Senger *et al.*, 1990; Harper y Bates, 2008), incluyendo células de ovario (Olson *et al.*, 1994) y de cérvix (Guidi *et al.*, 1995).

El VEGF es un potente estimulador de la proliferación de las células endoteliales y de la neo-vascularización (Rosales-Torres *et al.*, 2010), que también participa en el mantenimiento endotelial estructural y aumenta la permeabilidad de capilares y vénulas (Redmer *et al.*, 2001; Chaiworapongsa *et al.*, 2010).

La importancia del VEGF en la angiogénesis fue demostrada en ratones, donde la delección de al menos un alelo del gen es letal durante el desarrollo fetal, debido a una disrupción en la angiogénesis embrionaria (Carmeliet *et al.*, 1996; Ferrara *et al.*, 1997), mientras que su sobreexpresión también induce la muerte fetal por hipervascularización y anomalías cardíacas (Miquerol *et al.*, 2000). Existe amplia evidencia de que el VEGF, además de su función angiogénica, es un factor de supervivencia para células endoteliales, tanto *in vivo* como *in vitro*, ya que induce la expresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 (del inglés B-cell lymphoma 2), survivina y la proteína X-ligada al cromosoma IAP

(inhibidores de la apoptosis) (XIAP). Proponiéndose que el mecanismo de acción para esta función es mediante la activación de la vía de señalización de cinasa 3 de fosfatidil inositol (PI3K)/ proteína cinasa B (PKB o Akt) (Gerber *et al.*, 1998a; Gerber *et al.*, 1998b; Fujio y Walsh, 1999; Tran *et al.*, 2002).

Este factor pertenece a una familia de proteínas compuesta por VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y dos miembros más (Kaczmarek *et al.*, 2005) que se conocen como VEGF-E y VEGF-F (Hellmut y Augustin, 2000), así como por el factor de crecimiento placentario (PlGF) (Figura 1) (Yancopoulos *et al.*, 2000; Ferrara *et al.*, 2003). El VEGF-A es la forma predominante y la que posee mayor efecto sobre las células endoteliales por lo que ha sido la más estudiada, además de ser el transductor de señales más fuerte entre los distintos tipos del VEGF (Takahashi y Shibuya, 2005). En adelante, cuando hagamos mención al VEGF nos estaremos refiriendo a VEGF-A.

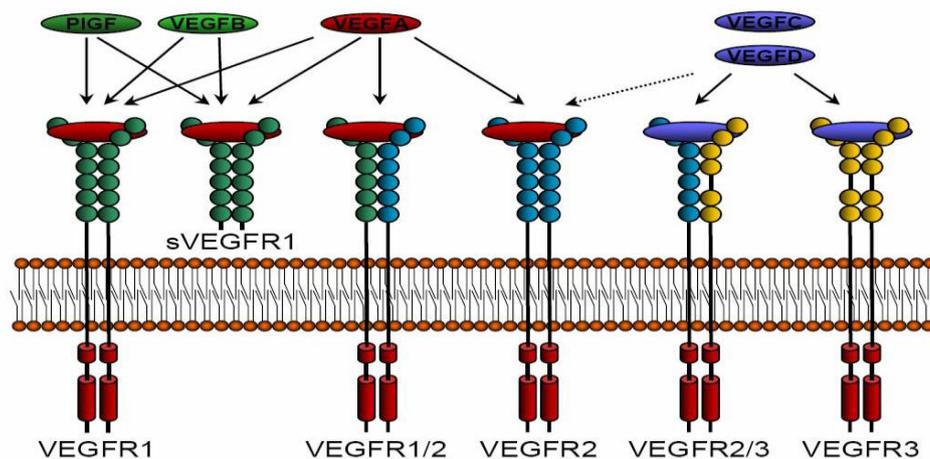


Figura 1: Familia del VEGF y sus receptores. El PIGF y el VEGFB sólo pueden unirse a las formas de membrana y soluble de VEGFR-1. El VEGF-A tiene capacidad para unirse tanto a los dos receptores presentes en las células endoteliales, VEGFR-1 y 2, como al receptor sVEGFR-1 y a los heterodímeros VEGFR-1/2. El VEGF-C sólo puede interactuar con VEGFR-3 o heterodímeros VEGFR2/3, ambos presentes en células endoteliales de vasos linfáticos. EL VEGF-D interactúa con los mismos receptores que el VEGF-C, y con el VEGFR-2 tras sufrir un procesamiento posterior (indicado en la figura con una flecha discontinua y solo para el caso de VEGF-D). Esquema adaptado de Olsson *et al.*, 2006.

1.1. Isoformas de VEGF

En mamíferos, se han identificado 12 isoformas de VEGF resultado del procesamiento alternativo (corte y empalme) del transcrito primario o pre-RNAM del gen de VEGF, que contiene 8 exones separados por 7 intrones (Nowak *et al.*, 2008). Las proteínas que resultan de las isoformas de VEGF contienen 121, 145, 148, 165, 183, 189 y 206 aminoácidos respectivamente (Papaioannou *et al.*, 2006). Todas las isoformas de VEGF contienen los exones 1 a 5 y 8, mientras que el procesamiento alternativo por corte y empalme (*splicing*) de los exones 6a, 6b y 7 determina cada una de las variantes, así como algunas características distintivas de cada una de las isoformas (Zygalaki *et al.*, 2005). Así, en la isoforma VEGF-206, están presentes los ocho exones; la isoforma VEGF-189 no cuenta con el exón 6b; la isoforma VEGF-165 pierde los exones 6a y 6b, mientras que la isoforma VEGF-121 no contiene los exones 6a, 6b y 7 (Robinson y Stringer, 2001). Los exones 3 y 4 contienen los sitios de unión para los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2, respectivamente (Ng *et al.*, 2006).

Recientemente, se ha demostrado que existen dos posibles exones 8, denominados 8a y 8b, y que mediante un procesamiento alternativo del preRNAm se van a originar dos formas del VEGF que difieren en los 6 aminoácidos finales del extremo C-terminal según se retenga el exón 8a o el 8b. Cuando el último intrón del preRNAm de VEGF se procesa en el sitio de salida proximal se retiene el exón 8a y no se traduce el 8b, dando origen a 7 isoformas angiogénicas VEGF_{xxxxa}, mientras que si el procesamiento se lleva a cabo en el sitio de corte distal se elimina el exón 8a y la secuencia del exón 8b se traduce, dando origen a 5 isoformas anti-angiogénicas VEGF_{xxxib}, siendo xxx el número de aminoácidos de la proteína de cada isoforma (Nowak *et al.*, 2008). Las isoformas angiogénicas son: VEGF-121a, VEGF-145a, VEGF-148a, VEGF-168a, VEGF-183a, VEGF-189a y VEGF-206a. Las isoformas anti-angiogénicas son: VEGF-121b, VEGF-165b, VEGF-145b, VEGF-183b y VEGF-189b (Figura 2) (Mura *et al.*, 2004; Nowak *et al.*, 2008; Harper y Bates, 2008).

Se ha observado que la mayoría de las isoformas del VEGF tienen un dominio de unión a la heparina que interactúa con las células que asocian proteoglicanos tipo heparan sulfato (HSPGs) (Ferrara, 2004). Las isoformas VEGF-121 y VEGF-165 son ácidas y no se unen fácilmente a la heparina, por lo que se han considerado como isoformas parcialmente solubles, la ausencia del dominio de unión a la heparina de la isoforma VEGF-121 y VEGF-165 da lugar a que sea altamente difusible (Ferrara *et al.*, 1997), y se difunden más fácilmente entre las células endoteliales, mientras que VEGF-189 y VEGF-206 son isoformas básicas y se encuentran asociadas a la matriz extracelular, haciéndolas insolubles y con menor difusión entre las células endoteliales (Ferrara y Davis-Smyth, 1997).

La actividad biológica de VEGF-145 no ha sido bien establecida (Cheung *et al.* 1995). Mientras que se ha identificado a VEGF-165 como la isoforma central en el desarrollo vascular, además de que es la predominante (Takahashi y Shibuya, 2005). Por otro lado, la primera isoforma anti-angiogénica de VEGF descrita fue VEGF-165b, en la cual se observó que no parecía estimular la proliferación o migración de las células endoteliales, ya que al unirse al receptor de membrana no estimula la fosforilación de los receptores. Posteriormente se descubrió que estaba conformada por una variante en el sitio de corte distal del intrón 7, eliminándose el intrón 8a y traducándose la secuencia de 8b, que queda en marco con el resto de la proteína, con el mismo número de aminoácidos que la isoforma VEGF-165a (Woolard *et al.*, 2004; Nowak *et al.*, 2008).

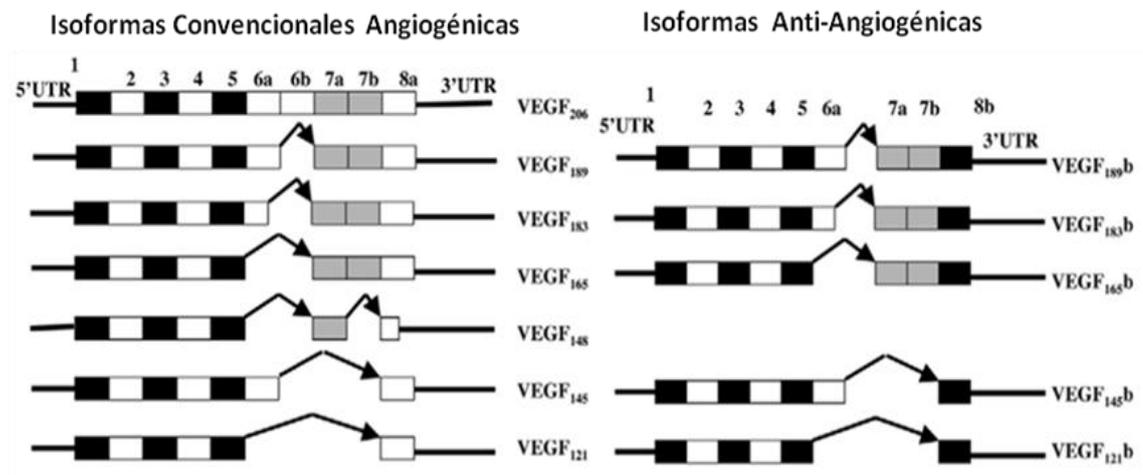


Figura 2. Isoformas de VEGF angiogénicas y anti-angiogénicas. En la imagen se muestran los exones que se mantienen y que se eliminan para dar origen a distintas isoformas (adaptado de Nowak *et al.*, 2008).

1.2. Regulación de VEGF

La expresión de VEGF está estrictamente regulada en todos los tejidos, debido a que un déficit o una sobreexpresión de esta molécula causarían diversas patologías. Esta regulación se da a través de diferentes mecanismos y factores, siendo uno de los principales la tensión de oxígeno. Se ha demostrado que la expresión del RNAm para VEGF es inducida bajo condiciones de hipoxia, ocasionadas en diversas situaciones fisiológicas o patológicas (Dor *et al.*, 2001). Otros inductores de la expresión de VEGF son algunos factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), los factores de crecimiento transformantes α y β (TGF α y TGF β) y el factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1) (Ferrara, 2004), lo que sugiere que la liberación autocrina o paracrina de estos factores coopera con la hipoxia local en la regulación de VEGF en el microambiente de algunos tejidos celulares ya que en otros es expresado constitutivamente como sucede en la cornea (Albuquerque *et al.*, 2009). Además, algunas citocinas inflamatorias como la interleucina 1 α (IL1 α) y la IL6 también son capaces de inducir la expresión de VEGF en distintos tipos celulares (Ben Av *et al.*, 1995; Cohen *et al.*, 1996).

Las hormonas también son importantes reguladoras de la expresión del gen de VEGF. Se ha demostrado que la hormona estimuladora de la tiroides (TSH) y la hormona adrenocorticotropica (ACTH) inducen la expresión de VEGF en líneas celulares de carcinoma tiroideo y en células de la corteza adrenal en cultivo (Soh *et al.*, 1996; Shifren *et al.*, 1998). Así mismo, las gonadotropinas como la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) son potentes inductoras de la transcripción de VEGF en ovario, tanto *in vivo* como *in vitro* (Christenson y Stouffer 1997). Existen además diversos estudios que ubican a los esteroides sexuales como potentes inductores de la expresión de VEGF en tejidos hormono-sensibles (Stewart *et al.*, 2001; Mueller *et al.*, 2003; Mueller *et al.*, 2000).

2. Funciones de VEGF

El VEGF tiene cuatro actividades biológicas principales que contribuyen a la inducción de la angiogénesis y que han sido estudiadas exhaustivamente:

- Crecimiento y proliferación (Ferrara *et al.*, 2003)
- Migración de células endoteliales (Neufeld *et al.*, 2002)
- Supervivencia de células endoteliales inmaduras mediante la prevención de la apoptosis (Ferrara 2002; Ferrara *et al.*, 2003)
- Aumento de la permeabilidad vascular de los capilares (Ferrara 2002; Ferrara *et al.*, 2003)

Por otro lado, el VEGF también parece estar involucrado en la supervivencia de las células madre hematopoyéticas, durante la repoblación vascular (Gerber *et al.*, 2002). Es posible que estos efectos estén mediados a través del receptor 2 del VEGF (Partanen *et al.*, 2001). Adicionalmente, se han observado efectos mitogénicos del VEGF *in vitro*, en sistemas que incluyen a las células epiteliales del pigmento retinal, células del conducto pancreático y células de Schwann, pero queda por determinar si estos efectos se producen *in vivo* (Guerrin *et al.*, 1995; Oberg-Welsh *et al.*, 1997; Sondell *et al.*, 1999).

En la angiogénesis, VEGF induce al estroma vascular no sólo como un mitógeno directo de las células endoteliales, sino como un potente mediador de la permeabilidad de los microvasos. Este factor se sobreexpresa en una variedad de tejidos benignos y malignos. En tejidos benignos, como los de ovarios (células foliculares y lúteas), trompas de Falopio, endometrio y tráquea, la expresión de VEGF puede indicar que esta sustancia desempeña un papel importante en la secreción luminal, aumentando la permeabilidad vascular local (Gordon *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1998). La hipoxia juega un papel importante en la regulación en la expresión genética de VEGF, estimulando 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 Queranocitos (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.*, 2002).

2.1. Angiogénesis

La angiogénesis ha sido ampliamente estudiada en condiciones patológicas, principalmente debido a que está aumentada en cáncer y otras enfermedades (Hanahan y Weinberg, 2000). En el adulto, la angiogénesis es infrecuente en condiciones fisiológicas y el endotelio de la mayoría de los tejidos es una población estable y de baja tasa mitótica (Klagsbrun y D'Amore 1996). Sin embargo, los tejidos del sistema reproductor femenino adulto presentan una alta tasa mitogénica sólo comparable al crecimiento tumoral (Reynolds *et al.* 1994), ocurriendo una angiogénesis fisiológica elevada en la placenta, la implantación y los cambios cíclicos del ovario y el endometrio (Stouffer *et al.* 2001). Debe considerarse que a diferencia de los procesos tumorales, la alta tasa de crecimiento de éstos tejidos ocurre en forma limitada y altamente ordenada, y es sostenida por el rápido desarrollo de una red vascular, de modo que los tejidos con mayor grado de desarrollo se caracterizan por estar altamente irrigados (Reynolds *et al.*, 1994). Por otro lado, se observa

angiogénesis significativa en procesos de reparación de tejidos, como cicatrización de heridas y fracturas (Folkman y Klagsbrun 1987).

2.2. Citoprotección

Uno de los mecanismos por el cual el VEGF promueve la formación de nuevos vasos sanguíneos es mantener la integridad de las células endoteliales en los vasos sanguíneos y la activación de señales de supervivencia o señales anti-apoptóticas. El VEGF ha mostrado ser un factor de supervivencia para células endoteliales en la retina (Alon *et al.*, 1995). En cultivos de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECs), el VEGF inhibe la apoptosis mediante la activación de señales: Akt / proteína cinasa B (PKB), y a través de la vía dependiente de fosfatidil inositol 3-cinasa (PI3K) (Gerber *et al.*, 1998b; Thakker *et al.*, 1999). Adicionalmente, el VEGF en células endoteliales, induce la expresión de Bcl-2 y A1 Gerber *et al.*, (1998b), que inhiben la activación de las caspasas, y regula dos miembros de la familia de IAP (proteínas inhibidoras de la apoptosis), survivina y X-ligada al cromosoma IAP (XIAP y NIAP), que inhiben el pro-dominio de las caspasas efectoras (Figura 3) (Tran *et al.*, 1999).

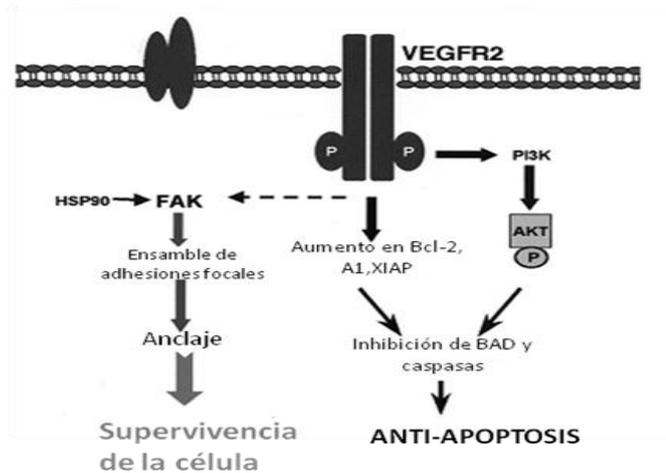


Figura 3. El VEGF estimula la supervivencia celular con señales anti-apoptóticas. La supervivencia de células endoteliales dependiente de VEGF está regulada en gran parte por la activación de PI3K mediada por la vía antiapoptótica Akt cinasa. El aumento de la fosforilación de la tirosina cinasa de adhesión focal (FAK) es un punto de la afinidad para la supervivencia y estímulos diversos en células endoteliales. VEGFR-2 también pueden desempeñar un papel en las funciones de supervivencia mediada por VEGF. Los Efectos anti-apoptóticos de más larga duración de VEGF implican la regulación positiva de las proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 y A1. La inhibición de la caspasa-9 y las caspasas efectoras 3 y 7 inhibe las señales pro-apoptóticas (tomado de Zachary *et al.*, 2001).

2.3. Proliferación

El VEGF estimula la síntesis de DNA y la proliferación de una variedad de líneas celulares endoteliales, induce fuertemente la actividad extracelular regulada por señales cinasas (ERK) 1 y 2 y la activación de esta vía, juega un papel central en la estimulación de la proliferación de células endoteliales (Zachary y Glik, 2001). El VEGF promueve la proliferación celular por la vía de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) que conduce a activar la proteína c-Jun N-terminal cinasa (JNK), además provoca la síntesis de la ciclina D1 y la cinasa dependiente de ciclina 4 en el ciclo celular (Zachary y Glik, 2001).

2.4 Permeabilidad Vascular

Estudios recientes sugieren que VEGF induce fenestraciones en las células endoteliales. Roberts *et al.*, (1997) demostraron que la administración tópica de VEGF producía la fenestración del endotelio de pequeñas vénulas y capilares, incluso en regiones en las que, en condiciones naturales, estos vasos no son fenestrados, como son los del cremáster o la piel (Roberts y Palade, 1995). Al formarse regiones fenestradas en la membrana plasmática, se permite que ésta sea altamente permeable a los pequeños solutos, lo cual, puede ser un mecanismo importante para que el VEGF module la permeabilidad vascular (Bradbury, 1984; Esser *et al.*, 1998).

El VEGF, además induce la permeabilidad vascular por medio del óxido nítrico (ON) y prostaciclina (PGI) (Wu *et al.*, 1999). El ON, una vez formado, puede difundir hacia las células subyacentes, donde activa a la enzima guanidicilasa (Gc) y ésta provoca el aumento intracelular de GMPc, mediador de los efectos fisiológicos. Así mismo, el VEGF activa la permeabilidad vascular por la fosfolipasa C-gama (PLC- γ), la fosforilación de la tirosina, la movilización del Ca^{2+} intracelular y la activación de la proteína cinasa C (PKC) (Wu *et al.*, 1999).

2.5. Migración

La degradación de la membrana basal es esencial para la migración de células endoteliales y es un paso clave al inicio de la angiogénesis fisiopatológica (Risau, 1997). El VEGF induce la expresión de metaloproteinasas y la degradación de la matriz (Lamoreaux *et al.*, 1998), lo cual es esencial para que ocurra la migración celular *in vivo*.

Un gran número de evidencias (Zachary y Glikli, 2001; Takahashi y Shibuya, 2005) indican que la señalización asociada a la proteína cinasa de adhesión focal (FAK) es fundamental para regular el número de contactos focales (o placas de fijación de los filamentos de actina) y la organización de filamentos de actina para la migración celular (Zachary y Glikli, 2001). El VEGF induce la fosforilación de la tirosina de FAK y paxilina, además de promover el reclutamiento de FAK a las nuevas adherencias focales en células HUVECs (Abedi y Zachary, 1997).

3. Receptores de membrana para VEGF: VEGFR-1, VEGFR-2

La actividad biológica de VEGF está mediada principalmente por dos receptores tipo tirosina cinasa, denominados VEGFR-1 (también llamado FLT-1 por las siglas en inglés de fms-like tyrosine kinase) y VEGFR-2 (también llamado KDR o Flk-1, cinasa fetal hepática-1). Tanto VEGFR-1 como VEGFR-2 poseen siete dominios semejantes a inmunoglobulina (Ig-like) en su región extracelular, un solo dominio transmembrana y dos secuencias tipo tirosina cinasa (Figura 1) (Ferrara, 2004). Ambos receptores han sido encontrados en células foliculares (Zimmerman *et al.*, 2001; Grazul-Bilska *et al.*, 2007) y en cuerpo lúteo (Berisha *et al.*, 2008). El papel que juegan estos receptores para mediar la actividad del VEGF sobre células endoteliales y de otro tipo es controversial (Ferrara, 2004; Kikuchi *et al.*, 2011).

El VEGF se une a los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 con alta afinidad, aunque existen diferencias entre ambos receptores, la afinidad de este factor de crecimiento por VEGFR-1 es mayor (constante de disociación K_d de 10-20 pM), (Chaiworapongsa *et al.*, 2010), que por VEGFR-2 (constante de

disociación, Kd de 75–125 pM) (Kikuchi *et al.*, 2011; Ferrara, 2004). Sin embargo, la capacidad de autofosforilación de VEGFR-2 es al menos diez veces mayor que la de VEGFR-1, lo cual nos indica que VEGFR-2 tiene una mayor capacidad en la transducción de la señal de VEGF que VEGFR-1 (Ferrara, 2004). Por lo tanto, para que se produzcan las respuestas biológicas por acción del VEGF es necesario que éste se una al receptor VEGFR-2 (Chaiworapongsa *et al.*, 2010). Algunos autores consideran a VEGFR-1 como un anzuelo para VEGF, que le quita la oportunidad de unirse a VEGFR-2 y por ello también le consideran con acción antiangiogénica (Yang *et al.*, 2002), sin embargo otros le han atribuido función en la proliferación celular, la quimiotaxis (Matsumoto *et al.*, 2002) y la supervivencia celular (LeCouter *et al.*, 2003).

El VEGF se une al segundo dominio Ig-like extracelular de los receptores, aunque son necesarios los tres primeros dominios para mantener la afinidad (Davis-Symth *et al.*, 1996). La unión de VEGF al receptor produce una dimerización con otro miembro de la familia de receptores, pudiendo formarse homodímeros o heterodímeros (Olson *et al.*, 1994). Posteriormente, se produce la autofosforilación de residuos de tirosina en el dominio intracelular del receptor. Estas fosfotirosinas sirven de unión para otros sustratos, iniciando una cascada de señales intracelulares. Esta cascada modula la activación de varias proteínas de señales de traducción, como la proteína cinasa mitógeno activada (MAPK), que activa la transcripción genética en el núcleo e induce múltiples respuestas celulares que incluyen alteraciones de la permeabilidad vascular, quimiotaxis, y acciones sobre el crecimiento celular (Zhachary *et al.*, 2001).

Waltenberger *et al.*, (1994) fueron los primeros en mostrar que la interacción de VEGF con los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 daba lugar a diferentes eventos celulares como migración, permeabilidad vascular, proliferación y supervivencia. Gille *et al.*, (2001), para explicar las distintas contribuciones de cada receptor a la señalización celular por VEGF, emplearon VEGF mutante selectivo para VEGFR-1 y VEGF mutante selectivo para VEGFR-2 valorando sus funciones en células endoteliales de vena umbilical humana, observando

que el VEGF selectivo para VEGFR-1 era incapaz de generar una señal mitogénica, como evidenciaba también su incapacidad para estimular actividad ERK (molécula estimuladora y reguladora de la vía tirosina cinasa), mientras que la activación del receptor VEGFR-2 por el VEGF selectivo para este receptor era suficiente para causar migración celular, siendo estimuladas las vías fosfatidil inositol 3-cinasa y la vía fosfolipasa Cy1. Del mismo modo, Gille *et al.*, (2001), en un estudio *in vivo* sobre la córnea en ratas, mostraron que el VEGF selectivo para el VEGFR-2 y VEGFR-1 era capaz de inducir angiogénesis y la estimulación de VEGFR-2, pero no cuando se unía a VEGFR-1.

El VEGFR-1, es una proteína de 180 Kda con afinidad para VEGF. Se ha descrito su expresión en las células endoteliales, así como en macrófagos, monocitos y células madre hematopoyéticas (Takahashi y Shibuya, 2005). El VEGFR-1 fue el primer receptor con actividad tirosina cinasa identificado (De Vries *et al.*, 1992), pero todavía se discute cuáles son sus funciones (Kikuchi *et al.*, 2011), ya que todo parece indicar que esas funciones varían dependiendo del estadio de desarrollo o del tipo celular en cuestión. Los homodímeros de VEGFR-1 tiene capacidad para reconocer al VEGF en sus formas A y B (Olofsson *et al.*, 1998; Park *et al.*, 1994), pero los heterodímeros de VEGFR-1/2 sólo pueden unirse al VEGF-A (Figura 1 y 4) (De Vries 1992; Guo *et al.*, 1995).

Se ha visto que los embriones de ratón desprovistos de VEGFR-1 unían tubos de células endoteliales como canales vasculares anómalos y fallecían en el útero debido a una carencia en la organización estructural de las paredes vasculares, y que la mutación de VEGFR-1 daba lugar a ratones con células endoteliales bien diferenciadas pero con fallo en estas células para organizarse en estructuras vasculares normales (Guo *et al.*, 1995). Por otro lado, el bloqueo de VEGFR-1 con anticuerpos previene la migración pero no la proliferación de las células endoteliales, en la vena umbilical humana en respuesta al VEGF, indicando la participación del VEGFR-1 en la migración de células endoteliales (Gerber *et al.*, 1997). Sin embargo, persiste un margen de duda considerable acerca de la posible existencia de otras funciones del VEGFR-1. Por otro lado,

el VEGFR-1 es responsable de la migración de macrófagos inducida por el VEGF (Clauss *et al.*, 1990) así como de la supresión de la maduración de células dendríticas Gabrilovich *et al.*, (1996), por lo que se ha considerado que el VEGFR-1 es un importante mediador del VEGF en células no endoteliales, mientras que en las células endoteliales funciona más como un regulador negativo de los efectos del VEGF mediados por el VEGFR-2 al poder reducir la cantidad de VEGF disponible (Shibuya, 2008). Finalmente, la expresión del VEGFR-1 es inducida por la hipoxia a través del factor inducible por hipoxia-1 (Gerber *et al.*, 1997).

Bussolati *et al.*, (2001) en un estudio realizado en células endoteliales de vena umbilical humana, observaron que la liberación de ON estimulada por VEGF se inhibe por el bloqueo del receptor VEGFR-1 y que el VEGFR-1 vía ON regula negativamente la proliferación celular endotelial mediada por VEGFR-2. Gerber *et al.* (1997), en estudios realizados *in vitro* en la misma línea celular con células expuestas a hipoxia observaron que el gen del receptor VEGFR-1 estaba inducido por la hipoxia, en contraste, el RNAm de VEGFR-2 de células expuestas a la hipoxia no estaba incrementado.

La interacción del VEGF con VEGFR-2 activa proliferación, migración, supervivencia y reorganización del citoesqueleto en CE. Además, el VEGF no sólo estimula un programa de proliferación en el endotelio, también pone en marcha propiedades citoprotectoras, con un papel crítico de la vía PI3K/Akt. Esta propiedad es fundamental en múltiples situaciones, incluyendo entre otras isquemia reperusión, neoplasia, inflamación, perfusión de órganos destinados al trasplante, shock y reendotelización de superficies denudadas (Ferrara, 1999).

El VEGFR-2, es una proteína de 200-230 KDa que tiene afinidad por el VEGF-A, (Terman *et al.*, 1992) así como por VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y VEGF-F (Takahashi y Shibuya, 2005; Yamazaki *et al.*, 2003). Ha sido descrito que la activación del VEGFR-2 da lugar a la autofosforilación de varios residuos de tirosina en el dominio cinasa, entre ellos los residuos de tirosina 1175 y 1214 (Takahashi y Shibuya, 2005), seguido por la unión de proteínas que contienen

el dominio Src homólogo-2 con fosfotirosinas (Shibuya, 2008). Se ha observado que este receptor es expresado por las células endoteliales vasculares, siendo considerado el marcador más precoz de los precursores de este tipo de células. El VEGFR-2 ha sido relacionado con la mayoría de los efectos del VEGF en las células endoteliales, como proliferación celular, producción de NO, prostaciclina, angiogénesis, permeabilidad vascular (Ferrara *et al.*, 2003) y un efecto citoprotector en células de la granulosa (Greenaway *et al.*, 2004). También se ha descrito que los neumocitos tipo II, los progenitores de células hematopoyéticas, y las células tumorales también expresan VEGFR-2. Además se ha encontrado la expresión de VEGFR-2 en células endoteliales linfáticas pudiendo estar implicado en la linfangiogénesis (Hirakawa *et al.*, 2005). Ratones sin el gen de VEGFR-2 se mueren por la ausencia de vasculogénesis y angiogénesis, lo que ha indicado el papel fundamental de este receptor en la biología vascular. Se ha encontrado que el VEGFR-2 desencadena la proliferación celular implicando la activación de la vía Erk y la asociación con caderina vascular-endotelial (Shibuya, 2008).

El VEGFR-2 participa en la activación del fosfatidil inositol 3-cinasa / vía Akt que regula a su vez, la supervivencia celular endotelial. La unión del ligando a VEGFR-2 es seguida de activación de cinasas de adhesión focal, p38 MAPK (proteína cinasa activada por mitógeno p38) y paxilina, lo cual capacita para la migración de células endoteliales. La permeabilidad inducida por VEGF está mediada por su interacción con Src, la activación de p38 MAPK y por la activación de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) (Takahashi y Shibuya, 2005; Ferrara *et al.*, 2003). Entre otras proteínas intracelulares activadas tras la unión del VEGF al VEGFR-2 podemos encontrar: proteínas Rac, PLC- γ , PKC, HSP27, Raf, MEK y p42/44 (Figura 4) (Takahashi y Shibuya, 2005).

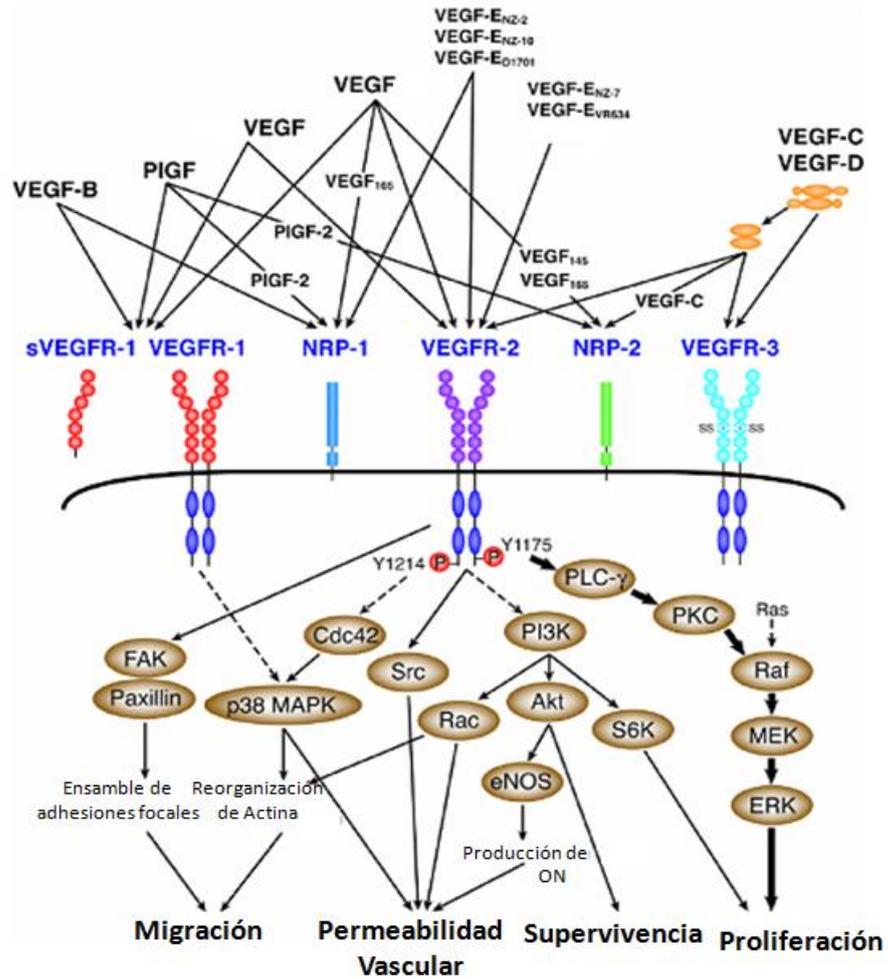


Figura 4: Señalización celular inducida por VEGF. Reproducida de: Takahashi, 2005.

3.1. Isoformas Solubles: sVEGFR-1 y sVEGFR-2

Mediante un procesamiento alternativo en el intrón 13 del preRNA_m de VEGFR-1, se produce una forma soluble de este receptor, conocido como sVEGFR-1 ó sflt-1 (soluble fms-like tyrosine kinase 1) (Shibuya, 2008). El receptor sVEGFR-1 no media ninguna señal de traducción, pero actúa como un modulador negativo para la biodisponibilidad de VEGF (Kaczmarek *et al.*, 2005).

Shibuya *et al.*, (1990) identificaron una banda de 2.5 a 3 kb utilizando la técnica de Northern blot, demostrando la presencia de la forma soluble de VEGFR-1. El RNA_m que codifica a este receptor se aisló de células umbilicales de vena humana (HUVEC). La secuencia de sVEGFR-1 es similar a la de VEGFR-1 en

los dominios parecidos a inmunoglobulina (Ig-like) del primero hasta el sexto, pero diferente a partir del sexto dominio, el RNAm de sVEGFR-1 contiene una porción del intrón 13, esto fue confirmado con el análisis de PCR y secuenciación genómica del DNA (Kendall y Thomas, 1993) Los receptores solubles sVEGFR-1 y sVEGFR 2 son procesados como resultado de un proceso alternativo de los respectivos pre-RNAm. La transcripción de los genes de *vegfr-1* y *vegfr-2* puede someterse a una transformación en 3' y la poliadenilación ocurre río abajo del exón 30, en este caso se forman los receptores transmembranales dando origen a las formas completas de estos receptores, o si ocurre la poliadenilación en el intrón 13, se da origen a las formas solubles las cuales son más cortas. En este último caso, las porciones transmembranales e intracelulares de la proteína se pierden, por lo tanto se vuelven incapaces de transmitir la señal de VEGF intracelularmente (Huckle y Roche, 2004). El séptimo dominio Ig-like de VEGFR-1, más el dominio transmembranal y los dominios intracelulares, no están presentes en la estructura de sVEGFR-1, lo cual da lugar a una proteína soluble (Kendall y Thomas, 1993). Al parecer la función principal del receptor sVEGFR-1 es secuestrar a VEGF y no permitir que realice su actividad biológica en la célula (Kendall y Thomas, 1993; Kendall *et al.*, 1996).

Se piensa que la función de sVEGFR-1 es mantener las monocapas de células endoteliales quiescentes, terminar la angiogénesis y la permeabilidad vascular a través de un mecanismo de retroalimentación negativa con el VEGF, y en los tejidos que normalmente son avasculares impide el crecimiento de vasos sanguíneos (He *et al.*, 1999; Kendall *et al.*, 1996). Se ha demostrado que sVEGFR-1 inhibe a VEGF bloqueando su actividad e impidiendo la migración de células HUVE *in vitro* (Ahmad y Ahmed, 2005). Se ha observado la expresión del receptor sVEGFR-1 en riñón de ratón adulto, hígado y útero (He *et al.*, 1999).

La expresión de sVEGFR-1 también se ha encontrado en células de carcinoma humano, de la línea celular MCF-7. Elkin *et al.*, (2004) mencionan que en los experimentos que realizaron, sVEGFR-1 parece ser inhibido por el tratamiento

con estrógenos, mostrando una posible relación entre los efectos de los estrógenos y el cáncer de mama, a través de sVEGFR-1 y VEGF y la vía de transducción de señales. Por otro lado, estudios *in vivo* reportados por Goldman *et al.* (1998) citan que sVEGFR-1 se disminuye significativamente en tumores con metástasis. En experimentos que utilizaron sVEGFR-1 con sólo los tres primeros dominios, inyectados a células tumorales de carcinoma folicular de tiroides (FTC) y posteriormente los trasplantaron en ratones, se demostró la inhibición del crecimiento tumoral (Ye *et al.*, 2004). Otros trabajos muestran a sVEGFR-1 como un efectivo inhibidor de la proliferación de células endoteliales *in vitro* e *in vivo* en la angiogénesis de modelos de cáncer (Hasumi *et al.*, 2002) y en modelos de neovascularización en retina (Rota *et al.*, 2004).

La preeclampsia en la mujer, se ha asociado con altos niveles de expresión del RNAm y de concentración de la proteína circulante de sVEGFR-1, lo cual sugiere un papel importante en la patogenia de la enfermedad (Ahmad y Ahmed, 2005). Similarmente, Rajakumar *et al.*, (2005) encontraron la presencia de la proteína sVEGFR-1 en tejidos de placenta y en células mononucleares de sangre periférica (PMBC's), de mujeres con preeclampsia, y demostraron que el aumento en la hipoxia regula positivamente la expresión de sVEGFR-1.

La expresión del RNAm de VEGFR-1 y sVEGFR-1 se encontró que cambia en la placenta de ratones gestantes al final de la gestación. Así, la expresión de VEGFR-1 se encontró que comenzó a disminuir, mientras que la expresión de sVEGFR-1 tendió a aumentar al final de la gestación en los ratones gestantes (He *et al.*, 1999). Los resultados de He *et al.*, (1999) sugieren que este cambio de equilibrio entre VEGFR-1 y sVEGFR-1 al final de la gestación es posiblemente un mecanismo para la regulación de la actividad de VEGF. Por otro lado, durante el primer trimestre de gestación, existen pocas evidencias de que sVEGFR-1 se exprese en el trofoblasto y vellosidades de la placenta (Ahmad y Ahmed, 2005). Sin embargo, la expresión más intensa se presenta durante el segundo trimestre en el sincitiotrofoblasto, según se ha observado por inmunolocalización en muestras de tejido de placenta humana (Ahmad y Ahmed, 2005). En placentas obtenidas a partir de gestaciones en ratones de la

línea BALB / c, hibridaciones *in situ* mostraron la expresión de sVEGFR-1 en células del trofoblasto en los días 13, 15 y 17 de gestación (He *et al.*, 1999).

En el ciclo reproductivo de mujeres, VEGFR-1 y VEGFR-2 se han encontrado relativamente estables a lo largo de todo el ciclo menstrual (Krussel *et al.*, 2001). Sin embargo, la expresión de sVEGFR-1 sigue un patrón distinto dependiendo de la fase (proliferativa y secretora) (Krussel *et al.*, 1999). La hipoxia parece ser parcialmente responsable de la regulación de sVEGFR-1. Un estudio mostró un aumento breve en sVEGFR-1, pero un aumento sostenido en los niveles del receptor completo de VEGFR-1 en células HUVEC incubadas con medios condicionados de células C6 de glioblastoma de rata en condiciones de hipoxia. Sin embargo, se ha sugerido que las alteraciones en los niveles de sVEGFR-1 podrían cambiar significativamente la actividad angiogénica del tumor derivado de VEGF (Goldman *et al.*, 1998). Es posible, por tanto, que un aumento en el cambio de la expresión de sVEGFR-1 en diferentes niveles podría influir en la vascularización de los tejidos (Goldman *et al.*, 1998).

Además de examinar a VEGFR-1 y sVEGFR-1 y la relación en su expresión, Elkin *et al.* (2004) mostraron la expresión de VEGFR-1 en células HUVEC; mientras que la de sVEGFR-1 predominaba en la línea de células normales de cáncer de mama. Aunque los estrógenos parecen no cambiar la expresión de VEGFR-1, si disminuyó significativamente sVEGFR-1 en células de carcinoma MCF-7 de mama en respuesta a los estrógenos. Además, *in vivo* la expresión de sVEGFR-1 en ratones desnudos se redujo con los estrógenos y condujo a un aumento en la densidad vascular. Elkin *et al.* (2004) mencionan que las células de tejido normal del seno son menos sensibles a los estrógenos, por lo que expresa sVEGFR-1 para capturar el VEGF endógeno y prevenir "la angiogénesis inadecuada". Sin embargo, especulan que en el cáncer de mama, las células serían principalmente sensible a los estrógenos, similar a las células MCF7, y por lo tanto permitiría una reducción de VEGFR-1 y sVEGFR-1 (Elkin *et al.*, 2004).

Estudios *in vitro* realizados por Gruemmer *et al* (2005) encontraron que el líquido folicular humano contiene un inhibidor de sVEGFR-1, y que al incubar células umbilicales HUVECs con 30% de líquido folicular humano hay una disminución de sVEGFR-1, evitando la proliferación de vasos sanguíneos y una inhibición de la producción de VEGF en las células endoteliales. El sVEGFR-1 puede actuar como antagonista, y capturar el VEGF libre y por lo tanto bloquear la angiogénesis mediada por este factor de crecimiento.

En otro estudio realizado por Rajakumar *et al.* (2005), la regulación positiva de VEGFR-1 y sVEGFR-1 en humanos ocurrió bajo condiciones de hipoxia. En este mismo estudio, los diferentes niveles de expresión de VEGFR-1 fueron detectados en células mononucleares de sangre periférica (PMBCs) de mujeres gestantes, y posteriormente reaccionaron de manera diferente bajo condiciones hipóxicas. Sin embargo, la proteína sVEGFR-1 se incrementó significativamente en condiciones de hipoxia y normoxia en células de la línea PMBCs de mujeres con preeclampsia sobre los niveles observados en las mujeres que no presentan preeclampsia (Rajakumar *et al.*, 2005).

Adicionalmente, en otros estudios se menciona que sVEGFR-1 se ha identificado en el suero de la mujer gestante y en los vasos umbilicales, cuya acción, según se ha demostrado, es la de inhibir los efectos del VEGF, por lo que es considerada una proteína antiangiogénica (Banks *et al.*, 1998). Diversos estudios Venkatesha *et al.*, (2006) Widmer *et al.*, (2007) han demostrado que sVEGFR-1 se encuentra elevado en la placenta y suero de mujeres con preeclampsia. Esta proteína se adhiere al dominio del receptor del VEGF y del factor de crecimiento placentario (PIGF), lo que impide su interacción con los receptores de membrana de las células endoteliales, que eventualmente conduce a disfunción endotelial. Se han asociado niveles elevados de sVEGFR-1 con disminución en las concentraciones sanguíneas de VEGF y PIGF durante la preeclampsia clínica e inclusive antes de su presentación. En la preeclampsia existe un fallo primario del trofoblasto para invadir el miometrio e inducir la remodelación de las arterias espirales uterinas durante la placentación, esto provoca una disminución de la perfusión de la placenta y

una situación de hipoxia que activa HIF-1, promueve la expresión de TGF β 3 y la síntesis del sVEGFR-1 (Vuorela *et al.*, 2000), que bloquea a VEGF y empeora la perfusión de la placenta. La concentración de la proteína sVEGFR-1 disminuye rápidamente después del parto en las mujeres (Widmer *et al.*, 2007). Además se ha demostrado que la administración exógena de sVEGFR-1 a ratas gestantes induce hipertensión, proteinuria y glomeruloendoteliosis.

Actualmente hay varios estudios que demuestran que también está presente la forma soluble de VEGFR-2 (sVEGFR-2) en suero de mujeres y en ratones (Tripathi *et al.*, 2009). El receptor sVEGFR-2 es procesado de la misma forma que el sVEGFR-1, la forma soluble de VEGFR-2 mantiene la misma afinidad por VEGF que el receptor de membrana. Debido a la falta del dominio de la tirosina cinasa, sVEGFR-1 y sVEGFR-2 no son capaces de llevar a cabo la transfosforilación de la tirosina y activar la transducción de señal para inducir los efectos de VEGF (Sert *et al.*, 2011). El sVEGFR-2 ha sido detectado en el suero de ratones (Wada *et al.*, 2009) y mujeres gestantes (Tripathi *et al.*, 2009). En mujeres, no hay diferencias significativas en la concentración de sVEGFR-2 en suero de mujeres gestantes sanas y no gestantes, sin embargo los niveles séricos de este receptor se vieron disminuidos en mujeres gestantes con preeclampsia en relación a las mujeres gestantes sanas, estos cambios se acompañaron de la reducción significativa de inmunoreactividad a VEGFR-2 en células endoteliales y células de Hofbauer placentarias de mujeres con preeclampsia con más de 34 semanas de gestación. (Tripathi *et al.*, 2009).

3.2. Regulación de los receptores del VEGF

VEGFR-1 y VEGFR-2

La expresión de VEGFR-1 y VEGFR-2 se localiza principalmente en el endotelio vascular. Ambos receptores poseen en la región del promotor una secuencia que permite su unión específica a las células endoteliales (Morishita *et al.*, 1995; Patterson *et al.*, 1995).

Se ha observado que VEGFR-2 muestra una mayor expresión en el endotelio de la periferia tumoral, mientras que VEGF se expresa principalmente

alrededor de la zona necrótica. La hipoxia tisular aumenta la expresión de VEGF, que a su vez aumenta la expresión de VEGFR-2 en el endotelio (Kremer *et al.*, 1997).

Además, se ha descubierto que VEGFR-1 muestra una secuencia de 430 pb en el promotor que es responsable de su activación transcripcional en condiciones de hipoxia. Parece ser que esta región está ausente en VEGFR-2 (Gerber *et al.*, 1997).

Se ha encontrado que el promotor del VEGFR-1 incluye un sitio de unión para el HIF β 2. En cambio aunque la hipoxia incrementaba la expresión genética de VEGFR-2, en el promotor de este receptor en ratones y en humanos no se encontraron elementos relacionados con HIF, sugiriendo que la hipoxia estimulaba posiblemente de forma indirecta la expresión del VEGFR-2, posiblemente vía generación y acción del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (Voelkel *et al.*, 2006).

El VEGF puede aumentar los receptores VEGFR-2 y VEGFR-1 *in vitro* como se ha mostrado en estudios realizados por Shen *et al.*, (1998) en cultivos de células donde observaron que el tratamiento con VEGF se acrecentaba la expresión del VEGFR-2 incrementando su transcripción genética, y su acción era a través del propio receptor VEGFR-2. También observaron que el ON regulaba negativamente la expresión del VEGFR-2.

3.3 Maduración Alternativa del RNAm de sVEGFR-1 y sVEGFR-2

Actualmente, se conoce que los genes de eucariontes están segmentados, lo que lleva a la producción de un transcrito primario de igual tamaño que el gen, llamado pre-RNA mensajero (pre-RNAm) o RNA heterogéneo nuclear (hnRNA). Esos transcritos son procesados o madurados en tres reacciones principales que son: a) La metilación en el extremo 5', que consiste en la adición del grupo trifosfatado 7-metilguanosina, denominado Cap, que es necesario para la unión al ribosoma al momento de la traducción. b) La poliadenilación en el extremo 3', que se refiere a la adición de adeninas en todos los mRNAs excepto en los de las histonas, llamada cola de poli A, la cual está formada por una secuencia de

aproximadamente 50 a 250 nucleótidos (Lewin, 2000). Esto al parecer evita la degradación del RNA. c) El corte y empalme (*splicing*), que es el proceso mediante el cual se eliminan las secuencias no codificantes o intrones (escindiéndolos del pre-RNAm) y se unen o empalman los exones para generar el RNA mensajero maduro o RNAm. (Minvielle-Sebastia y Keller, 1999).

Como se ha visto, el extremo 3' de un RNAm contiene una cadena de residuos de adenosina que forman una cola de poli (A). Conforme se secuenciaron diferentes RNAm resultó evidente que la cola de poli A comienza invariablemente unos 20 nucleótidos corriente abajo de la secuencia AAUAAA. En el transcrito primario esta secuencia sirve como sitio de reconocimiento para el ensamblaje de un complejo de proteínas que realizan mecanismos de procesamiento en el extremo 3' del RNAm (Beaudoing *et al.*, 2000; Edmonds, 2002; Zhao *et al.*, 1999). El complejo de procesamiento del ensamblado de poli (A) también se relaciona de manera física con la polimerasa de RNA cuando ésta sintetiza el transcrito primario (Lewin, 2000; Zhao *et al.*, 1999).

El corte y empalme de intrones es un proceso que químicamente consiste de dos reacciones sucesivas de trans esterificación. El corte y el empalme son dependientes de la hidrólisis de ATP y son catalizados por un gran complejo de ribonucleoproteínas llamado "spliceosoma". Este proceso dará como resultado la formación del RNAm maduro, que será transportado al citoplasma, donde será traducido a proteína. El corte y empalme se lleva a cabo en el núcleo, (Frendewey y Keller, 1985; Penotti, 1991; Reed y Palandjian, 1997; Wagner and Garcia-Blanco, 2001; Watakabe *et al.*, 1993; Wu y Manley, 1989).

En resumen, el pre-RNAm se forma a partir de un gen segmentado y tiene varios sitios de acción cis o elementos de la misma secuencia. Los sitios más conservados son los dinucleótidos GU y AG en los lugares de unión exón-intrón (sitios de *splicing* 5') e intrón y exón (sitios de *splicing* 3'), respectivamente. El punto de empalme (*branchpoint*) es en general una adenina y mantiene una secuencia consenso, al menos para el caso de levaduras. Entre el sitio de empalme y el sitio del dinucleótido AG se encuentra una región rica en pirimidinas (uracilos, usualmente) llamada la región Py (García *et al.*, 2007). En

el primer paso de trans esterificación, el grupo OH de la ribosa del residuo de adenina en el sitio de empalme, realiza un ataque nucleofílico hacia el sitio de splicing 5', generando una ruptura del enlace fosfodiéster. Al mismo tiempo, la guanina del dinucleótido realiza un enlace a través de su extremo 5' con el lado 2' del residuo de adenina en el sitio de empalme. Después ocurre la segunda reacción de trans esterificación, en la cual el grupo OH del extremo del exón realiza un ataque nucleofílico hacia el sitio de splicing 3'. (Wagner y Garcia-Blanco, 2001). Como resultado, se libera el intrón como una estructura en forma de reata o lariat, al mismo tiempo que se unen los exones para generar el RNAm maduro. El intrón en forma de lariat se rompe nuevamente en su enlace 5'-2' y se lineariza, posibilitando que sea degradado o bien procesado nuevamente para dar lugar a un RNA pequeño nucleolar rico en uracilo (UsnoRNA) (Lewin, 2008).

Para que se lleve a cabo el procesamiento de los intrones se requieren varios factores, que incluyen diferentes tipos de RNA y proteínas que son:

1) Los RNA pequeños nucleares cuyas longitudes oscilan entre 60 y 300 nucleótidos y son ricos en residuos de uracilo (UsnRNAs). Los cinco tipos son: el U1snRNA, el U2snRNA, el U4snRNA, el U5snRNA y el U6snRNA. El U3snRNA participa en eventos de maduración del pre-rRNA (RNA ribosomal inmaduro o precursor). Estos RNAs son transcritos por la RNA polimerasa II, salvo el U6snRNA, que lo transcribe la RNA polimerasa III. En el núcleo, los UsnRNAs se asocian con proteínas para formar ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (UsnRNPs) (García *et al.*, 2007).

2) Las partículas ribonucleoproteicas heterogéneas nucleares (hnRNPs) que contienen RNA heterogéneo nuclear (hnRNA), son estabilizadoras, es decir, su función radica en asociarse al pre-RNAm para impedir la formación de estructuras secundarias dadas por el apareamiento de bases. De esta manera, el pre-RNAm permanece accesible para interactuar con otras moléculas (García *et al.*, 2007).

3) Las proteínas SR (proteínas con dominios ricos en Serina y Arginina) representan una familia de factores de splicing que se reporta en vertebrados, invertebrados y plantas. La secuencia de aminoácidos en estas proteínas es rica en residuos de serina (S) y arginina (R) en el extremo carboxilo, formando el dominio SR (García *et al.*, 2007). Estas proteínas tienen varios papeles reguladores en el splicing como son la definición de los sitios de splicing y el acercamiento de las regiones de los dinucleótidos. Estas proteínas nucleares de 20 a 75 kDa, tienen capacidad de fosforilarse y se subdividen en: A) De Tipo I, las cuales presentan un solo Motivo de Reconocimiento a RNA (RRM) en el extremo amino-terminal y su dominio SR carboxilo Terminal, y B) de Tipo II, las cuales presentan dos Motivos de Reconocimiento a RNA (RRMs) y un dominio carboxilo terminal SR (Wagner y Garcia-Blanco, 2001; García *et al.*, 2007).

Los RNAm de sVEGFR-1 y sVEGFR-2 surgen del mismo gen de VEGFR-1 y VEGFR-2, que tiene un mismo sitio para comenzar la transcripción, pero el transcrito primario del RNAm es procesado de forma diferente en el extremo 3', dando lugar a los m específicos de sVEGFR-1 y sVEGFR-2 respectivamente (Albuquerque *et al.*, 2009). El transcrito de VEGFR-1 contiene 30 exones y es traducido a una proteína transmembranal de aproximadamente 180 kDa, Terman *et al.*, (1992) que contiene un dominio extracelular N-terminal con dominios de unión al ligando, un único segmento que atraviesa la membrana y dos dominios de tirosina cinasa y un C-terminal. El transcrito de sVEGFR-1 contiene únicamente los primeros 13 exones de VEGFR-1, y la proteína a la que da lugar conserva los sitios inmunoglobulínicos dos y tres de unión al ligando, pero carece de la región intramembrana y de los 2 dominios tirosina cinasa intracelulares, por lo que la proteína sVEGFR-1 se secreta como una proteína de 116 kDa aproximadamente (Ahmad y Ahmed, 2005), que se puede unir a VEGF con gran afinidad (Kd 20-30 pM), funcionando como antagonista del VEGF circulante (Kendall y Thomas, 1993; Huckle y Roche, 2004) (Figura 5). Este receptor soluble, al igual que los otros dos receptores VEGFR-1 y VEGFR-2, compite por el ligando VEGF, sin embargo la información actual sobre este receptor aun es poca sobre la regulación natural de sVEGFR-1 (Kaczmarek *et al.*, 2005; Sela *et al.*, 2008). Estudios recientes han comenzado

a establecer las funciones fisiológicas de sVEGFR-1 en diversos tejidos como la córnea y el útero, demostrándose un papel fisiopatológico de sVEGFR-1 en el embarazo (Thomas *et al.*, 2007). En el animal de granja en donde se ha visto la expresión del RNAm de sVEGFR-1, es en la cerda y se sugiere que este receptor está implicado en la remodelación tisular que debe ocurrir para que se dé la implantación del embrión en las cerdas (Kaczmarek *et al.*, 2009).

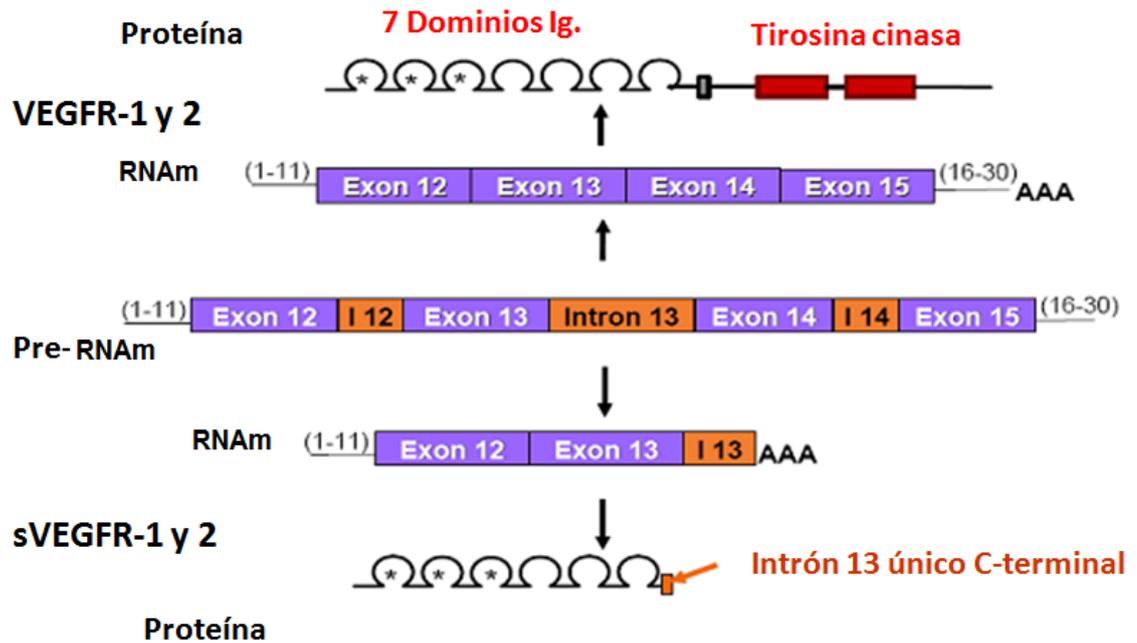


Figura 5. Comparación de la estructura de VEGFR-1 y 2 y sVEGFR-1 y 2. Codificación del gen de VEGFR-1 y 2 el procesamiento alternativo del RNAm que codifica para la proteína de sVEGFR-1 y 2 (adaptado de Roche, 2005).

Guo *et al.* (2009) menciona que el transcrito del receptor VEGFR-2, al igual que el del receptor VEGFR-1, sufre un procesamiento alternativo de corte y poliadenilación del extremo 3' del transcrito primario del RNAm, y como resultado de esto se obtiene un transcrito específico de sVEGFR-2. Este receptor soluble conserva su alta afinidad por VEGF, aunque su unión al factor es más débil que en el caso de sVEGFR-1. sVEGFR-2 tiene un efecto antiangiogénico y ha sido detectado en córnea de humanos y en ratones y en el plasma de seres humanos (Wada *et al.*, 2008; Ebos *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2009; Albuquerque *et al.*, 2009).

4. Olas de crecimiento folicular

En 1946, Bullough utilizó como modelo el ratón y describió la relación entre el ovario, el desarrollo folicular y las hormonas. Los estudios sobre la dinámica folicular en el ciclo estral se reportaron por primera vez en ratas por Mandle y Zukerman, (1950) y en monos en 1951 por Green y Zukerman. Hammond, (1955), fue el primero en describir las fases del ciclo estral en ganado vacuno. Rajakoski, (1960) menciona por primera vez la propuesta de dos ondas u olas de crecimiento folicular en el ciclo estral de los bovinos. Rajakoski, (1960) realizó experimentos en diversos aspectos de la dinámica folicular durante el ciclo estral del bovino, que resultaron en contradicciones con lo observado en el desarrollo de los folículos, que iban desde la ausencia de las ondas o bien de tres a cuatro ondas distintas por cada ciclo estral. En revisiones posteriores, la teoría de las dos ondas de Rajakoski fue discutida considerando evaluación cualitativa de datos y el conocimiento actual que se tiene en relación al ovario, gonadotropinas y esteroides. Adams (1999) presentó evidencias para apoyar el concepto de que los folículos son reclutados continuamente a lo largo del ciclo y el folículo destinado a ovular es seleccionado por la coincidencia de su etapa de madurez y la capacidad de responder a las gonadotropinas. Sin embargo, con la introducción de la ecografía en la década de 1980, la barrera que existía para la comprensión de la dinámica folicular fue esclarecida (Singh *et al.*, 2003).

En la mayoría de los ciclos estrales (> 95%) de las hembras de los bovinos se presentan dos o tres ondas foliculares (Adams *et al.*, 1998). En los ciclos de dos y tres ondas, la aparición de la primera onda folicular se produce constantemente en el día de la ovulación (día 0). La emergencia de la segunda ola se produce el día 9 ó 10 en ciclos de dos ondas, y el día 8 ó 9 en los ciclos de tres ondas. En los ciclos de tres ondas, la tercera ola se inicia el día 15 ó 16. Bajo la influencia de progesterona (por ejemplo en el diestro), el folículo dominante sufre atresia. El folículo dominante presente en el inicio de la luteólisis, se convierte en el folículo que será ovulado. El cuerpo lúteo (CL) comienza su regresión antes en ciclos de dos ondas (Día 16), que en los ciclos

de tres ondas (Día 19), resultando el ciclo estral más corto en animales con dos ondas que en aquellos que presentan tres ondas (19 a 20 días versus 22 a 23 días). Por lo tanto, el ciclo estral en los bovinos de 21 días existe sólo como un promedio entre dos y tres ondas en el ciclo (Adams *et al.*, 2008).

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).

4.1. Selección del folículo Dominante

La dominancia folicular es el mecanismo por el cual el folículo seleccionado domina y ejerce un efecto inhibitorio sobre los folículos de la misma cohorte, además de evitar el reclutamiento de otros folículos (Webb *et al.*, 1999). El folículo dominante alcanza un tamaño superior al de los demás, es responsable de la mayor secreción de estradiol (E_2), responde a niveles bajos de hormona folículo estimulante (FSH) y tiene receptores a hormona luteinizante (LH) en teca y granulosa. La dominancia folicular se establece una vez que el folículo seleccionado alcanza un tamaño de aproximadamente 8 - 8.5 mm de diámetro y produce niveles altos de E_2 e inhibina, lo cual ocasiona una disminución en la concentración circulante de FSH (Figura 6) (Kulick *et al.*, 1999; Ireland *et al.*, 2000).

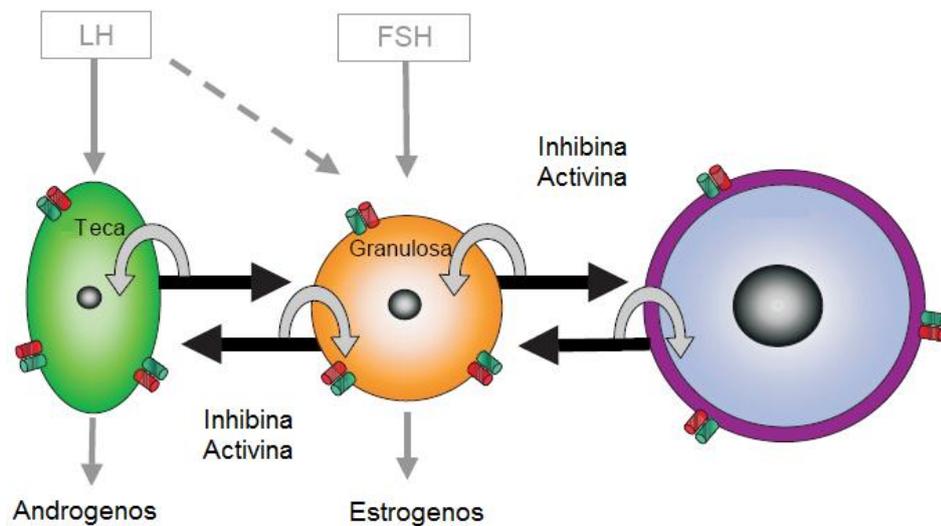


Figura 6. Representación de las células de la teca, granulosa, ovocito, y los receptores que están presentes en células de la teca y granulosa así como las hormonas que producen cada tipo celular. Adaptado de Knight y Claire Glistler, (2006).

Durante la primera ola de crecimiento folicular, la dominancia se establece alrededor del día 4 de iniciada, aproximadamente el día 5 ó 6 del ciclo (Rivera y Fortune, 2003). Algunos autores mencionan que los folículos ejercen la dominancia de 3 a 4 días, y después declina su producción de estradiol e inhibina y se vuelven atrésicos también (Bao y Gaverick, 1998; Adams, 1999; Fortune *et al.*, 2001).

Como se mencionó anteriormente hay mecanismos que regulan los procesos de selección y dominancia que han sido ampliamente estudiados, pero aún no están completamente entendidos. La capacidad de respuestas a gonadotropinas y factores de crecimiento determina el destino hacia la ovulación o la atresia folicular. (Adams, 1999; Webb *et al.*, 1999). La emergencia de cada oleada folicular está precedida por un pico transitorio de FSH. Cada ola de crecimiento folicular consta de tres eventos fundamentales (reclutamiento, selección y dominancia). Las oleadas de crecimiento están conformadas por cohortes de folículos que son seleccionados para crecer a partir de las reservas en reposo, éstos inician un crecimiento rápido bajo el estímulo de la hormona FSH, evidenciándose en ellos un incremento del RNAm para la enzima P450 aromatasa, responsable de la biotransformación de

andrógenos a E₂ (Evans y Fortune, 1997; Fortune *et al.*, 2001; Henao y Trujillo, 2000). Entre los folículos reclutados en cada oleada, se establece una competencia por la dominancia, en la cual un solo folículo de la cohorte adquiere el desarrollo funcional y estructural que le permitirá seguir creciendo en un ambiente de baja concentración de gonadotropinas, al tiempo que sus compañeros de cohorte sufren atresia (Henao y Trujillo, 2000).

El folículo seleccionado como dominante ejerce un efecto inhibitorio sobre el resto de folículos de su misma cohorte, además de evitar el reclutamiento o surgimiento de una nueva ola de crecimiento folicular (Webb *et al.*, 1999). Dentro de los aspectos funcionales y estructurales que caracterizan a las células del folículo dominante están los altos niveles de RNAm para receptores a gonadotropinas, principalmente del receptor de la hormona luteinizante (LHR), proteínas y enzimas involucradas en la síntesis de andrógenos y progestágenos: 17 α hidroxilasa (17 α OH), P₄₅₀aromatasa, 3 β hidroxisteroide deshidrogenasa (3 β HSD) y proteína StAR (por sus siglas en inglés Steroidogenic Actue Rregulatory protein) (Evans y Fortune, 1997).

A pesar de que no se conoce exactamente por qué un folículo se selecciona como dominante, se postula que éste posee una mayor sensibilidad a FSH, debido a una mayor expresión de receptores de FSH y/o LH. Asociado a este proceso, el estradiol y los factores de crecimiento locales ejercen un efecto permisivo, amplificando la acción de la FSH en los folículos que están madurando. Sin embargo, el aumento de estradiol e inhibina, también ejerce una retroalimentación negativa sobre la liberación de FSH a nivel hipotálamo-hipófisis, lo cual evita que otros folículos sigan desarrollándose (McGee y Hsueh 2000; Zeleznik *et al.* 1981).

Además, la disminución de FSH provocaría un descenso de la actividad de la aromatasa dependiente de FSH (que es la que transforma andrógenos a estrógenos) lo que limita, como consecuencia, la disponibilidad de estrógenos en los folículos menos maduros. Esto llevaría a la disminución de la proliferación de las células de granulosa y al aumento de andrógenos, provocando una atresia irreversible (Webb *et al.*, 2004).

Además de gonadotropinas y hormonas esteroides, en el crecimiento y desarrollo folicular algunos factores de crecimiento desempeñan un papel fundamental (Webb *et al.*, 2004), entre ellos destaca el VEGF, el cual regula la angiogénesis del folículo y cuerpo lúteo tanto en condiciones fisiológicas como en las patológicas (Ribeiro *et al.*, 2007). La angiogénesis tiene un papel primordial durante el desarrollo folicular. Los vasos sanguíneos están confinados a la teca y no penetran la capa basamental que separa a estas células de las de la granulosa (Stouffer *et al.*, 2001; Zeleznik *et al.*, 1981). Aunque la angiogénesis folicular es exclusiva de la teca, las células de la granulosa de alguna manera también modulan este proceso al producir diversos factores angiogénicos que actúan sobre los vasos sanguíneos de la teca (Grasselli *et al.*, 2003).

5. Atresia folicular

La atresia folicular es un fenómeno característico en la vida de los mamíferos, durante la vida reproductiva la mayoría de los ovocitos antes de llegar a la ovulación son eliminados mediante este proceso (Rosales *et al.*, 2008). El concepto atresia es un término griego que significa a = no, tresos = perforación. En el ovario se distinguen diversas fases de degeneración celular, como la presentan las células germinales, que ocasiona la mayor parte de las pérdidas de ovocitos que se da en el ovario antes del nacimiento y de la degeneración folicular (atresia) en la etapa posnatal (Rosales, *et al.*, 2000).

Se estima que al nacimiento, el número de ovocitos en ambos ovarios varía (60 000 a 80 000) de acuerdo con la especie y la raza. Sin embargo, no todos estos ovocitos serán capaces de alcanzar el estado maduro. Por cada ovocito que madura y es ovulado, varios inician su desarrollo pero nunca llegan a la maduración, por tal motivo cualquier ovario normal contiene un gran número de ovocitos en degeneración dentro de los folículos que no pudieron alcanzar su desarrollo total (Hsueh *et al.*, 1997).

En la atresia folicular, la muerte celular por apoptosis es uno de los principales eventos, la cual ocurre principalmente en las células de la granulosa (Flores-

Pérez *et al.*, 2005). En la atresia folicular se encuentran implicados diversos factores reguladores locales, como las hormonas esteroides sexuales, factores de crecimiento, las citocinas y las gonadotropinas hipofisarias FSH y LH (McGee y Hsueh, 2000).

En condiciones naturales, la atresia es un proceso paulatino e irreversible de degeneración folicular. Rosales *et al.*, (2000) han propuesto que las alteraciones morfológicas de un folículo en degeneración dependen del grado de atresia alcanzado. En la atresia destacan diversos cambios morfológicos e histológicos, como son: núcleos picnóticos y/o fragmentación nuclear en las células de la granulosa, desprendimiento de las células de la granulosa por la pérdida de la matriz extracelular, desprendimiento del complejo cumulus-ovocito y en algunos casos hipertrofia en las células de la teca (Flores *et al.*, 2005). Además, ocurren procesos bioquímicos como la reducción en la síntesis y cantidad de DNA en células de la granulosa (Rosales *et al.*, 2000; Flores *et al.*, 2005), pérdida de uniones comunicantes, así como la disminución de receptores a gonadotropinas (Tilly *et al.*, 1996).

Es importante resaltar que durante la atresia se produce el aumento en la expresión de varios genes, entre ellos el de las proteínas unidoras del factor de crecimiento semejante a la insulina (IGBPs), el de la catepsina-D y el del receptor para la angiotensina II (Murdoch.,1992). Además, en la atresia participan enzimas lisosomales (fosfatasa ácida y glucosaminidasa) (Rosales *et al.*, 2000), las involucradas en la remodelación tisular como colagenasas, Pz-peptidasa y el activador del plasminógeno entre otras (Froment *et al.*, 2003). Se han realizado diversos estudios bioquímicos, moleculares e inmunológicos, en los que se ha demostrado la fragmentación inter-nucleosomal del DNA en las células foliculares, lo cual ha permitido conocer que la apoptosis es el tipo de muerte preponderante en la atresia, aunque no el único (Alonso- Pozos *et al.*, 2003).

La atresia folicular podría significar una ventaja evolutiva, siendo seleccionados aquellos folículos que contengan ovocitos saludables para que puedan llegar exitosamente a ser ovulados. El tipo celular que evidencia el proceso de

apoptosis más claramente es el de las células de granulosa. Sin embargo, en algunas especies como cerdos, pollo y rata, se ha observado la ocurrencia de este proceso en las células de la teca, aunque de forma más tardía (Foghi *et al.* 1998; Tilly *et al.* 1996).

Existen diversos factores atretogénicos en ovario y también, factores que favorecen la supervivencia celular. Dentro de los primeros podemos mencionar GnRH-I, IL-6, andrógenos, TNF- α , FasL, etc (Parborell *et al.* 2002; Parborell *et al.* 2005; Chun y Hsueh 1998). Como factores citoprotectores ováricos encontramos el VEGF, Factor de Crecimiento Epidermal (EGF), el Factor de Crecimiento similar a Insulina tipo 1 (IGF-1) y el Factor Transformante tipo β (TGF- β). También las hormonas esteroideas son factores supresores o estimulantes de la apoptosis dependiendo del tejido en el que actúan. Por ejemplo, los glucocorticoides estimulan la apoptosis en el timo pero no en testículo (Tapanainen *et al.* 1993) y los estrógenos, inhiben la apoptosis en ovario (Billig *et al.* 1993). Cabe destacar que la relación andrógenos/estrógenos es elevada en líquido folicular de folículos atrésicos (Carson *et al.* 1981).

Las gonadotrofinas son consideradas como los principales factores de supervivencia folicular. Se ha demostrado que los folículos atrésicos tempranos son rescatados por la administración exógena de gonadotrofinas (Braw y Tsafiriri 1980) y que la administración de FSH en ratas hipofisectomizadas inmaduras disminuye la apoptosis folicular en células de la granulosa (Chun y Hsueh, 1998).

Estos son solo algunos ejemplos de los múltiples factores que regulan el proceso de atresia folicular. El destino final de los folículos (crecimiento/ovulación o atresia) depende del delicado balance entre la expresión y acción de factores que promueven la proliferación, el desarrollo y la diferenciación de las células del folículo ovárico y de aquellos que promueven la apoptosis de las mismas llevando al folículo a la atresia (Rosales *et al.*, 2008).

6. Evidencias de la participación de VEGF y sus receptores en el desarrollo folicular y la atresia

Los cambios cíclicos en el ovario y el útero están asociados con distintas fases del crecimiento, maduración y eventual regresión de vasos sanguíneos (Hellmut y Augustin, 2000). Se sabe que el ovario es uno de los pocos órganos en el adulto en donde ocurre una intensa angiogénesis fisiológica y se observa además un aumento en la permeabilidad vascular durante el desarrollo folicular, la ovulación y la posterior formación del cuerpo lúteo (Fraser, 2006). El incremento en la vascularización y el flujo sanguíneo de los tejidos es un reflejo de sus altas demandas metabólicas (Reynolds y Redmer, 1998; Barboni *et al.*, 2000). La vascularización del folículo es necesaria para que éste reciba hormonas, factores de crecimiento, oxígeno, nutrientes y en general sustratos para su desarrollo (Wulff *et al.*, 2000). Durante el proceso de la angiogénesis intervienen factores de crecimiento, como el FGF y la angiopoyetina 1 y 2 (ANP1, 2), sin embargo, el VEGF es el factor más importante en este proceso (Yin-Shang *et al.*; 2005).

El VEGF es un agente mitogénico para las células endoteliales derivadas de arterias y venas, y también es estimulante de la permeabilidad vascular (Berisha *et al.*, 2000 y Ferrara *et al.*, 1997). El VEGF participa en el crecimiento y diferenciación celular durante la foliculogénesis (Greenaway *et al.*, 2005). El incremento vascular resulta de la participación de gonadotropinas y mejora el flujo sanguíneo en folículos preovulatorios (Wulff *et al.*, 2001 y Zimmerman *et al.*, 2001).

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).

El RNAm para VEGF se localiza en el folículo, y se asocia con el crecimiento folicular y la dominancia. (Rosales –Torres *et al.*, 2010).

La angiogénesis se encuentra regulada independientemente en cada uno de los folículos y, dependiendo de la extensión del plexo vascular y de la permeabilidad de sus vasos, se puede controlar el suministro de factores tróficos de alto peso molecular, precursores y lípidos. Esto indicaría que los vasos sanguíneos foliculares estarían directamente involucrados en los procesos de selección, dominancia y atresia (Fraser 2006; Rosales –Torres *et al* 2010).

Los folículos primordiales y primarios reciben nutrientes y oxígeno por difusión pasiva de los vasos estromales. El crecimiento folicular se asocia con cambios en el desarrollo de una red capilar individual y a una angiogénesis continua destinada a nutrir al folículo en rápido crecimiento (Reynolds y Redmer, 1998). Así mismo la maduración del folículo preovulatorio requiere el desarrollo de una vasculatura suficiente para el aporte de colesterol unido a lipoproteínas (Davis *et al.*, 2003). Los vasos sanguíneos que se desarrollan están confinados a la teca y están separados de la capa de células de granulosa por la presencia de la membrana basal. La capa de células de granulosa se mantiene avascular hasta su ruptura durante la ovulación (Stouffer *et al.* 2001).

La degeneración de los capilares puede ser la causa de la atresia folicular, lo cual ocurre normalmente en el ovario con aquellos folículos que fallan en su desarrollo. En bovinos se ha demostrado que, durante este proceso, ocurre apoptosis en los capilares tecales (Jiang *et al.*, 2003; Rosales-Torres *et al.*, 2010). En la ovulación, los elementos vasculares emergen de la teca luego de la ruptura folicular e invaden la capa avascular de células de la granulosa, estableciéndose una red capilar que nutrirá al cuerpo lúteo en desarrollo. En forma inversa, la integridad de la vasculatura luteal declina durante la luteólisis al final del ciclo. Este impresionante ciclo de neovascularización, estabilización y degeneración vascular ocurre en respuesta a factores angiogénicos locales producidos por las células de la granulosa o luteales (Tamanini y De Ambrogi, 2004; Hazzard *et al.*, 2000).

A pesar de que la angiogénesis ocurre en la capa de células de la teca, las células de la granulosa juegan un papel muy importante en este proceso, ya que sintetizan y secretan diversos factores angiogénicos que actúan luego en forma paracrina en las células endoteliales de la capa tecal. Estos factores producidos por las células de granulosa controlan el desarrollo y crecimiento de la vasculatura folicular (Tamanini y De Ambrogi 2004). El aumento de la vasculatura del folículo lleva a un suministro preferencial de gonadotrofinas y, por lo tanto, jugaría un rol en la selección del folículo dominante (Zelevnik *et al.* 1981).

En folículos de bovinos y porcinos, VEGF está levemente expresado durante el desarrollo folicular temprano y esta expresión aumenta tanto en granulosa como en teca junto con el desarrollo del folículo dominante (Barboni *et al.* 2000; Greenaway *et al.* 2004). En ratas, tanto los niveles de la proteína de VEGF como de su receptor VEGFR-2 aumentan en células de granulosa y teca a medida que el folículo crece (Abramovich *et al.* 2009).

El VEGF y sus receptores, han mostrado ser claves en la regulación de la vascularidad del folículo (Barboni *et al.*, 2000; Zimmermann *et al.*, 2001; Shimizu *et al.*, 2003; Greenaway *et al.*, 2004). En cerdas miniatura se ha mostrado que la inducción de una sobre expresión de VEGF incrementa la expresión de VEGFR-1, sin que se muestren cambios en la expresión de VEGFR-2 (Shimizu *et al.*, 2003). Mattioli *et al.*, (2001) citan que los folículos de cerdas maduras tratadas con gonadotropina coriónica equina (eCG) expresaban niveles elevados de VEGF en el líquido folicular y desarrollaban una mayor área vascular en comparación con los folículos atrésicos, como con los folículos que expresaban niveles bajos de VEGF.

El efecto de VEGF sobre células foliculares no ha sido del todo esclarecido. En células de la granulosa de bovino, VEGF ejerce un efecto citoprotector a través del VEGFR-2 y se ha mostrado que la expresión de la proteína del VEGF y del VEGFR-2 en este tipo celular, se incrementa conforme aumenta el tamaño del folículo de >0.5 cm a 1 cm de diámetro y que conforme avanza el grado de atresia folicular, la expresión del VEGFR-2 disminuye (Greenaway *et al.*, 2004).

Shimizu y Miyamoto (2007) demostraron que la progesterona estimula la expresión de VEGF-120 y su receptor VEGFR-2 en células de la granulosa en cultivo así mismo Shimizu *et al.*, (2003) observaron que los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 después de la administración de eCG en cerdas se incrementaba la expresión de RNAm de ambos receptores, en folículos pequeños, medianos y grandes.

Zimmermann *et al.*, (2003), observaron que la administración de un anti-VEGFR-2 inhibía la angiogénesis folicular dependiente de gonadotropinas, bloqueando consecuentemente el desarrollo de los folículos antrales maduros, con lo que concluyeron que en el ovario la interacción VEGF/VEGFR-2 juega un papel crítico en el proceso de desarrollo folicular dependiente de gonadotropinas. Además se ha observado que la inhibición del VEGFR-2 no afecta la supervivencia de la vasculatura existente en el folículo, pero si la de formación de nuevos vasos ya que al administrar eCG a los folículos preantrales pequeños se desarrollaron a folículos antrales tempranos pero no a folículos ovulatorios.

Wulff *et al.*, (2000), en su trabajo realizado con monos tití en donde se inhibió a VEGF con un antagonista (VEGF trap R1 y R2), encontraron que después del tratamiento, el número de folículos atrésicos se incrementó considerablemente en comparación con el grupo control, además reportaron que el diámetro de los folículos de los animales control fue mayor que en los folículos de animales tratados, así encontraron una correlación entre la reducción de la vascularización y la atresia.

En algunas estructuras ováricas de diferentes especies se ha encontrado el RNA mensajero y las proteínas de VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, sVEGFR-1 y sVEGFR-2 (Cuadro 1).

Cuadro 1. Localización de VEGF y sus receptores de membrana y solubles

Molécula	Estructura Anatómica	Función	Especie	Bibliografía
VEGF	Células de la granulosa y teca y CL		Bovinos, cerdas, humanos y ratón	Shimizu2002, 2003 y 2007, Berisha <i>et al.</i> 2000, Ribeiro <i>et al</i> 2007, Greenaway <i>et al</i> 2004. Trousdale <i>et al.</i> , 2007.
VEGFR-1	Células de la granulosa y teca y CL	En teca y células. lúteas, formación de vasos sanguíneos. En la granulosa, no se sabe	Bovino y cerdas	Einspaner <i>et al.</i> , 2002, Shimizu2002, 2003 y 2007, Berisha <i>et al.</i> 2000, Ribeiro <i>et al</i> 2007
VEGFR-2	Células de la granulosa y teca y CL	En teca y células. lúteas, formación de vasos sanguíneos. En la granulosa, une a VEGF para proteger a las células de la apoptosis	Bovino y cerdas	Einspaner <i>et al.</i> , 2002, Shimizu2002, 2003 y 2007, Berisha <i>et al.</i> 2000, Ribeiro <i>et al</i> 2007 Greenaway <i>et al</i> 2004
sVEGFR-1	Células del endometrio y de la placenta	Tiene actividad antiangiogénica porque se une a VEGF, sin producir señal biológica	Humano y ratón	Hastings <i>et al.</i> , 2003, Gruemmer <i>et al.</i> , 2005 Thomas <i>et al</i> 2007,
	Aplicación en folículos preovulatorios inhibe a VEGF		Mono rhesus	Xu <i>et al.</i> 2005
	Cuerpo lúteo		Cerdas	Kaczmarek <i>et al.</i> 2009
sVEGFR-2	Placenta Cornea	Tiene actividad antiangiogénica porque se une a VEGF, sin producir señal biológica	Humano y ratón	Wada <i>et al.</i> , 2009, Tripathi <i>et al.</i> , 2009, Albuquerque <i>et al.</i> , 2009

La relación de la angiogénesis folicular y el inicio de la atresia son controversiales, debido a las dificultades de establecer una relación temporal entre los dos fenómenos. Sin embargo Greenaway *et al.* (2004) exponen que VEGF tiene un papel como citoprotector de las células de la granulosa de bovinos. La expresión de VEGF y VEGFR-2 protegen a las células de la granulosa de los bovinos de la muerte celular y por lo tanto a los folículos de la atresia. En los folículos sanos hay una baja incidencia de apoptosis debido a la alta expresión de VEGFR-2 en células de la granulosa, de forma opuesta a lo que ocurre en los folículos atrésicos tempranos, donde hay un aumento en la muerte celular de las células de la granulosa por la reducción de VEGFR-2. La reducción en la muerte celular por VEGF parece estar mediada a través de la reducción en la expresión de la caspasa 3 activa. Con las evidencias descritas de la actividad de VEGF y sus receptores de membrana pudiéramos pensar que la expresión de los receptores solubles de VEGF que tienen actividad antiangiogénica en diferentes sistemas biológicos evitando que VEGF se una a su receptor de membrana bloqueando las señales de VEGF en la célula pueda estar implicada en la atresia folicular. Los receptores solubles pueden modular la actividad fisiológica de VEGF, así como la angiogénesis en el tracto reproductivo femenino (Thomas *et al.*, 2007).

III. Planteamiento del problema

Existen evidencias suficientes en la bibliografía para aceptar que tanto en el crecimiento como en el desarrollo de los folículos ováricos, la presencia de una apropiada red vascular es un evento fundamental, con lo cual se garantiza el aporte de sustratos, hormonas, nutrientes, oxígeno, etc., que son necesarios para cubrir las demandas de los eventos fisiológicos que ocurren en el ovario en cada onda folicular. Sin embargo, poco se conoce sobre la regulación de los factores que permiten que ocurre el adecuado aprovisionamiento de todo aquello que requieren los folículos para su desarrollo. El factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) parece jugar un papel fundamental, no solo en el proceso angiogénico necesario en este caso, sino como protector celular en las células endoteliales y en la capa granulosa del folículo. Según podemos

deducir de la bibliografía existente, en diversos sistemas celulares la angiogénesis o antiangiogénesis de un tejido es el resultado de un fino equilibrio entre la acción del ligando, que bien puede ser cualquiera de las isoformas angiogénicas o antiangiogénicas ($VEGF_{xxx_a}$ ó $VEGF_{xxx_b}$), con los receptores de membrana (VEGFR-1 y VEGFR-2) ó con las formas solubles de los receptores de membrana (sVEGFR-1 y sVEGFR-2). Existen muchas limitantes para comprender con precisión el orden de prelación con el cual participan cada uno de los integrantes de este complejo sistema; y esto se vuelve más complejo cuando en órganos como el ovario y sus estructuras, la información sobre este sistema es aún más escasa. En el folículo ovárico, se desconoce si existen las formas solubles de los receptores para VEGF y qué importancia pueden tener éstos en la dominancia del folículo, por lo anterior nosotros nos planteamos indagar si los folículos dominantes de la vaca expresan el RNAm para los receptores sVEGFR-1 y sVEGFR-2 y como se modifica su patrón de expresión en los días 4, 6 y 9 del ciclo estral de esta especie.

IV. HIPÓTESIS

Los RNAm para los receptores sVEGFR-1 y sVEGFR-2 están presentes en las células de folículos de bovinos y la presencia del RNAm de ambos receptores será mayor en folículos dominantes del día 9 que en los del día 4 y 6 del ciclo estral.

V. OBJETIVOS

A. Objetivo General

1. Indagar la presencia del RNAm de las formas solubles de VEGFR-1 y VEGFR-2 en células de folículos de bovino y conocer las variaciones en el patrón de expresión en los días 4, 6 y 9 del ciclo.

B. Objetivos Particulares

1. Buscar la expresión de RNAm de sVEGFR-1 y sVEGFR-2 en células de folículos de bovino.

2. Comparar las secuencias de los receptores sVEGFR-1 y sVEGFR-2 del bovino, con las reportadas en otras especies.
3. Conocer los cambios en el patrón de expresión de sVEGFR-1 y sVEGFR-2 en folículos dominantes del día 4, 6 y 9 del ciclo en bovinos.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

Lugar de realización

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de “Bioquímica de la Reproducción” de la Unidad Xochimilco, de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-X), en el laboratorio de Biotecnología de la UAM Iztapalapa y en el laboratorio de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

En la Figura 7 se presenta un diagrama donde se resumen las actividades de la parte experimental.

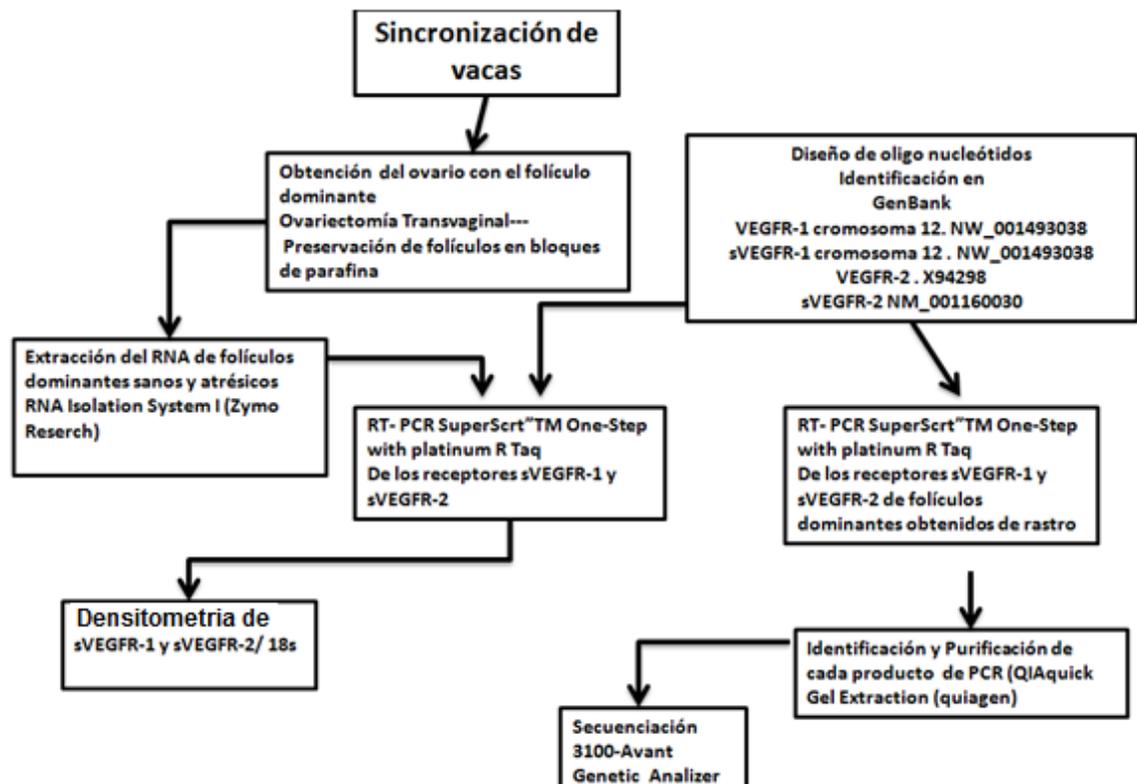


Figura 7. Diseño experimental

Se sincronizó la ovulación de 15 vacas raza Holstein Frisian, utilizando un dispositivo intravaginal de progestágenos (CIDR) durante 9 días. En el día 7 se aplicó PGF2- α en dosis de 25 mg/animal, y a los 3 días de ser retirado el CIDR se aplicaron 100 μ g de GnRH (Gonadorelina), considerando este como el día 0. 3 días después de la aplicación de GnRH, se realizó ultrasonografía a todas las vacas para verificar la ovulación y ubicar el ovario con el folículo dominante en cada vaca. Se realizó ovariectomía unilateral en los días 4 (n=5), 6 (n=5) y 9 (n=4) del ciclo estral, para recuperar el ovario con el folículo dominante (Figura 8).

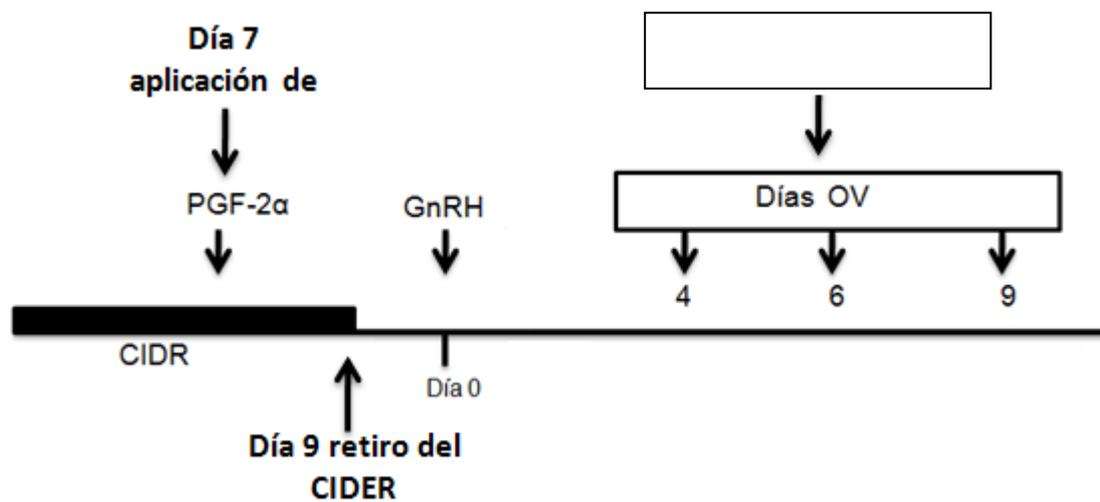


Figura 8. Esquema de inducción de ovulación. Línea más oscura: Progesterona por 9 días: CIDR, Pfizer (Progesterona al 10%, 1.9 g). PGF2 α : Prosolvin C (Cloprostenol, 25 mg). GnRH: Gonadorelina, Intervet (Buserelina, 0.010 mg). Ovariectomía (OV) día 4 (D4), 6 (D6), y 9 (D9).

Secuenciación de sVEGFR-1 y sVEGFR-2 y RT-PCR

Diseño de oligonucleótidos

Las secuencias de los genes de bovino fueron obtenidas a partir de la base de datos del GenBank (VEGFR-1 entrada NW_001493038, sVEGFR-1 entrada NW_001493038; VEGFR-2 entrada X94298, sVEGFR-2 entrada NW_001495197.2). Se ubicaron las secuencias de exones de cada receptor de acuerdo a las variantes alternativas que existen en humano, y se adaptaron en los genes de los receptores de bovino. En las secuencias que se presentan a continuación se muestra en color verde la parte que corresponde al exón 12 y

en color amarillo el exón 13, el rojo y azul son parte del intrón 13 del gen de VEGFR-1 y VEGFR-2. Las secuencias de los oligonucleótidos o cebadores usados para la síntesis de cDNA de ambos receptores solubles y la posterior secuenciación (amplicón de sVEGFR-1, 584 pb, y de sVEGFR-2, 648 pb) se presentan en un recuadro en la Figura 9. Las partes subrayadas es donde se ubicaron los oligonucleótidos para la RT-PCR con las cuales se calculó la abundancia relativa de sVEGFR-1 y sVEGFR-2 en las células de los folículos del día 4, 6 y 9 del ciclo estral de bovinos (amplicón de sVEGFR-1, 68 pb y de sVEGFR-2, 72 pb). Para hacer el diseño de los olinucléotidos específicos de los receptores solubles, en ambos casos (sVEGFR-1 y sVEGFR-2) se ubicó el oligonucleótido reverso en el intron 13. Para lo anterior, se utilizó el software Primer Express versión 2.0 (Applied Biosystems), y posteriormente se enviaron para su síntesis a Applied Biosystems.

sVEGFR-1

```

ACGTCTAGTA CCTTGGTTGTGGCTGACGCTAGA ATTTCTGGAATCTACACTTGCATGGCTACCAATAAAGTCGGGACT
GTGGAAAGAAACATGAACTTTTACATCACAGATGTGCCCATGGATTTTCATGTGACCTTGGACAAAATGCCTGCGGAA
GGAGAGGACCTGAAGCTGTCTTGCACAGTGAGCAAGTTTTTGTACAAAGACATAACCTGGATTTTGTCTGCGGACAGTG
AACAAACCAGACCACGCAACAGAGCATCAGCAAGCAAAAGACACCTGTACGAAAGAGCACTCCATGACGTTCAACCTC
GTCATCAAGAACGCCTCCCTGGAAGACTCGGGCACCTATGCCTGCCGAGCTAGGAACATATACACAGGGGAAGAAATC
CTCCAGAAGAAAGTAGATCATTAGAGGTGAGCACTGCAACAAAAGGCTGTTTTCTCTCGGATCTCCAAATTTAA
AGCACGAGGAATGATGTACCGCACAAAATAATGTAACATTAAGGACTCATTACCAAGTAACAGTTGTCTCATAT
CATCTTGATTTATTGTCACTGTTGCT CATTTTCCGGCTCAGAGGAGAA

```

sVEGFR-2

```

ACTGTAA GTA CTACTCTTGTTATCCAAGCGGCCA ATGTGTCTGCTTTGTATAAATGTGAAGCAGTGAACAAAGCTGGAAGA
GGAGAGAGGGTTATCTCCTTCCATGTGACCA GGGGTCTTGAAATCACACTGCAACCTGGCATCCAGCCCACCGAGCAG
GAGAATGTGTCTCTGTGGTGCTCTGCGGACAGAACTATGTTGAGAACCACAGTGGTACAAACTCGGCCACAGGCC
CTGCCCATCCACATGGGCGATTTACCCACACCTGTCTGCAAGAACTTGGATGCTCTTTGGAAAATGAATGCCACCATG
AACTCTAACGGCACAAATGACATCTTGATCTTGGAGCTGCAGAATGCATCCTTGCAGGACCAAGGAGACTATGTCTGC
TTTGCTCAGGACAGGAAGACTAAGAAAAGACATTGTGTGGCCAGGAGCTCACAGTCCTAGGTAGGGCAGTCACTCTG
GACCATCCAGAGGCAGTTGGGTTGCCTTCAATGTA ATGCTTTCAGGGCCATGAGAAGATGTCTTCTATGTGCTTAT
ATATTAGACAGATGAGCTCATATCTGACTCACAAAACCTCCTCAAGGCA GAAGGAAGCTAATCATGCTGAAG TGATGT
ATTGAAAAGAGAAAATAATCCTATTCTTTCCAACCCTGATGGTGGGATCACTCACTGCTGTCTTCAGGGGATTACC

```

Figura 9. Diseño de oligonucleótidos de sVEGFR-1 y sVEGFR-2. Secuencias en color verde corresponden al exón 12, color amarillo al exón 13, color rojo corresponde a la parte proximal del intrón 13 que no se procesa y contiene una secuencia que codifica el extremo C-terminal de los receptores solubles, color azul corresponde a secuencias del intrón 13 no codificantes en el RNAm de los receptores solubles. Las secuencias que se encuentran en el recuadro corresponden a la posición de los primers para el amplicon grande, y las partes subrayadas corresponden a la posición de los primers para el amplicon pequeño (sentido y reverso respectivamente).

Para la secuenciación de las formas solubles de los receptores se utilizaron ovarios obtenidos del rastro, se transportaron al laboratorio en un buffer de fosfatos (PBS) a pH de 7.4. Los ovarios se disecaron y se obtuvieron los folículos dominantes. Se trabajó aproximadamente con 100 mg de homogenizados de células de la granulosa y teca, al que se le agregó 1ml de una solución de fenol y guanidina, y se procedió a la extracción del RNA, siguiendo el método de tiocinato de guanidina descrito por Chomczynski and Sacchi (1987), con Trizol (Invitrogene, Cat. No. 15596-018). Se homogenizó el tejido en presencia de la solución de tiocinato en una relación del 10% peso/volumen. Una vez homogenizado se le agregaron 200 µl de cloroformo, se agitó durante 15 segundos, se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 12000x g durante 15 minutos a 4°C. Después de la centrifugación se separó la fase acuosa (RNA total), parte superior, y la parte inferior fue descartada. La fase acuosa (RNA total) se transfirió a un tubo eppendorf nuevo, y se le añadieron 500 µl de isopropanol frío (4°C), se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos y se centrifugó nuevamente 12000x g por 10 minutos a 4°C. El RNA que se precipitó se lavó con 1ml de etanol al 75%, se mezcló y se centrifugó nuevamente a 7500x g, por 5 minutos a 4°C. Posteriormente el precipitado se dejó secar hasta estar completamente seco, y se disolvió con agua inyectable. Se realizó la lectura del RNAm en el Espectrofotómetro UV-Vis, y se cuantificó en un Beckman DU 530, a 260 y 280 nm. La calidad del RNA se verificó mediante la relación 260/280, la integridad del RNA se verificó haciendo correr una muestra en un gel de agarosa al 2% en Tris Acetato (TAE) como amortiguador de corrida (Tris Acetato 0.04M, 57.1 ml de ácido acético glacial y EDTA 0.5M pH 8.0) en una cámara horizontal de electroforesis (Horizontal 58) a 90 mV/min por 1 hora y se revelaron en un analizador de imagen BioChemSystem, UV-Vis.

Con 1 µg de RNA total tratado con DNAasa y 0.2 µM de los oligonucleótidos para sVEGFR-1, sVEGFR-2 (Cuadro 2) se realizó una RT-PCR en un solo paso utilizando el estuche comercial "SuperScript™" One-Step RT-PCR with platinum® Taq (Invitrogen, life technologies, Cat No. 10928-042), con las siguientes condiciones: síntesis de DNAc y pre-desnaturalización 50°C por 30

minutos; amplificación PCR 35 ciclos desnaturalización 94°C por 15 segundos, anclaje 57 °C por 30 segundos, extensión 70°C por 1 minuto; extensión final, a 72°C por 10 minutos, finalización a 4°C. La RT-PCR se realizó en un termociclador de gradiente (Mastercycler gradiente, Eppendorff AG).

Cuadro 2. Oligonucleótidos de sVEGFR-1 y sVEGFR-2 utilizados para la secuenciación y la densitometría.

Gen	Secuencia	Tamaño de amplicón
sVEGFR-1	Fwd: CCTTGGTTGTGGCTGACGCTAGA Rev: TTCTCCTCTGAGCCGGAAAATG	584 pb
	Fwd: CATTAGAGGTGGCACTGCAACA Rev: TTCCTCGTCTTTTAAATTTGGA	68 pb
sVEGFR-2	Fwd:TTCTGTTATCCAAGCGGCCAAT Rev:TTCTGCCTTGAGGAGTTTTGGTG	648 pb
	Fwd: TCTTGTTATCCAAGCGGCCAAT Rev: TTCTGCCTTGAGGAGTTTTGGTG	72 pb

Secuencias de oligonucleótidos de sVEGFR-1 y sVEGFR-2. Las secuencias que producen amplicones grandes (584 y 648 pb) se utilizaron para la secuenciación en ambos receptores y las secuencias que corresponden a amplicones pequeños (68 y 72 pb) se utilizaron para el análisis de densitometría.

Los productos de la RT-PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2 %, donde se tomaron 30 µl del producto de RT-PCR, 10 µl de buffer de carga y 10 µl de Bromuro de Etidio para obtener un volumen final de 50 µl, así como el marcador de peso molecular y se dejó correr a 90 volts/50 miliamperes. El gel se visualizó en un transiluminador BioChemi Darkroom (UVP Bioimaging Systems) para observar las bandas. Posteriormente, se cortaron las bandas que correspondían a cada receptor, las cuales coincidieron con el tamaño del amplicón. De acuerdo con las indicaciones del estuche comercial QIAquick gel extraction (Qiagen, número de catálogo 28704) se procedió a la purificación de la banda para eliminar residuos de agarosa 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.

Para constatar que el DNA se purificó correctamente, nuevamente se corrió un gel de agarosa al 2% con 3 µl del producto de la purificación, 3 µl de buffer de carga y 3 µl de Bromuro de Etidio, para obtener un volumen final de 9 µl, más el marcador de peso molecular. Las condiciones de electroforesis fueron las mismas que se mencionan renglones arriba.

Cuarenta microlitros de la reacción de PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 2%, y las bandas de amplificación del tamaño esperado se extrajeron del gel con el QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Aproximadamente 0.5 µg de cDNA purificado se secuenciaron utilizando los oligonucleótidos descritos anteriormente, como cebadores de secuenciación en un ABI Prism 3100 analizador genético Avant (Applied Biosystems). Los resultados fueron analizados con el software 7.1.0 DNASTar Lasergene (DNASTAR).

RT-PCR Semicuantitativa

Extracción de RNA de Tejido Parafinado

Se realizaron 10 cortes de 20 μm de grosor de cada folículo dominante, con un micrótopo (Leica RM 21). Los cortes fueron montados en laminillas identificadas con el número de cada animal. Se procedió a separar el folículo del estroma con navajas de bisturí, eliminando la parte que correspondía al líquido folicular, los cortes de cada folículo se pusieron y envolvieron en telas absorbentes de 8 x 8 cm, previamente esterilizadas. Los paquetes se pusieron sobre cajas de Petri y se procedió a retirar la parafina del tejido, de acuerdo al siguiente protocolo.

Desparafinado:

1. Las cajas Petri con los cortes foliculares envueltos en tela se pusieron en un horno (Felisa Modelo FE-242) a 60 °C por 40 min, y se observó el tejido para verificar que estuviera perfectamente bien desparafinado y poder continuar con los de mas pasos.
2. El tejido se pasó por alcoholes en concentraciones descendentes (Cuadro 3), realizando dos lavados con los diferentes alcoholes con la excepción del alcohol al 50% donde se realizó un solo lavado.

Cuadro 3. Tren de desparafinado

Xilol	2 lavados	30 segundos
Alcohol 100%	2 lavados	30 segundos
Alcohol 96%	2 lavados	30 segundos
Alcohol 70%	2 lavados	30 segundos
Alcohol 50%	1 lavado	30 segundos
Agua	2 lavados	30 segundos

Para la extracción de RNA total se utilizó un estuche comercial de aislamiento para tejido parafinado (Pinpoint™ Slide RNA Isolation System II, Zymo Research catálogo R1007) y se siguieron las indicaciones del fabricante. El RNA total se cuantificó por medio del espectrofotómetro a una lectura de 260 nm y la integridad del RNA se verificó por electroforesis en un gel de agarosa al 2%.

Por medio de la técnica de RT-PCR punto final se obtuvo la expresión de los RNA mensajeros de sVEGFR-1, sVEGFR-2 (Cuadro 2) y 18s como gen constitutivo (Banu *et al.*, 2005) (Applied Biosystems 4319413E-0702028), que produce un amplicón de 187 pb.

El producto de RT-PCR se corrió en geles de electroforesis, para lo cual se tomaron 10 µl de cDNA y se le adicionaron 2 µl de bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y 15 µl de solución de carga (0.25 g de azul de bromofenol; 7.5 g de ficoll tipo 400). La mezcla se colocó en un gel de agarosa al 2%, disuelto en TAE y se corrió a 90 mV/min por 1 hora. Todos los geles se corrieron con un marcador de peso molecular de 50 pb. (Labber, Promega USA).

Cuando finalizó la electroforesis, los geles fueron analizados en un transiluminador (ApiChemi, Biochemi System UVP Biologing Systems Bioelec), el nivel de expresión de los diferentes DNAs de sVEGFR-1 y sVEGFR-2 se estimó en forma individual por densitometría. El análisis de densidad óptica se realizó con el programa LabWorks 4.0, en el que se analizaron las bandas individuales que estuvieron en el área correspondiente a 68 pb para sVEGFR-1, 72 pb para sVEGFR-2 y 187 pb para el 18s. De cada banda localizada se tomó el valor que le correspondió en pares de bases y la máxima intensidad óptica (maxIOD). A la relación de maxIOD del mRNA de cada receptor sVEGFR-1 y sVEGFR-2 entre la maxIOD del mRNA de 18s se conoce como abundancia relativa.

Análisis Estadísticos

Los resultados se presentan como error estándar de las diferencias de la abundancia relativa de cada receptor sVEGFR-1 y sVEGFR-2, y se compararon en los diferentes días de dominancia folicular por ANOVA. Los análisis estadísticos se realizaron con el Software GenStat versión 12.0 (VSN International).

VII. Resultados

Se detectó la expresión del RNAm de los receptores solubles sVEGFR-1 (Figura. 10 A) y sVEGFR-2 (Figura 10 B) en células de folículos dominantes de bovino.

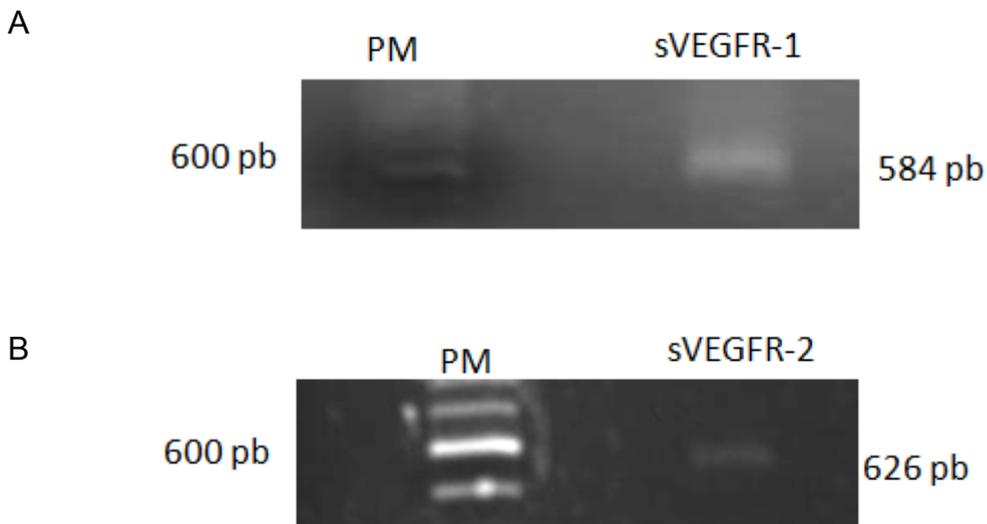


Figura 10. Identificación de sVEGFR-1 y sVEGFR-2 en células de folículo de bovino. En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular (PM) y en el segundo carril se observa una banda de 584 pb que corresponde al tamaño del amplicón del receptor sVEGFR-1 (A) y en el segundo caso una banda de 626 pb que corresponde al tamaño del amplicón del receptor sVEGFR-2 (B).

Los resultados de la secuenciación de los productos de las RT-PCRs correspondientes para cada receptor soluble se presentan en la Figura 5.

En la figura 11 A se muestra la secuencia de cDNA de los receptores solubles, las letras que no están en cursiva y en negritas corresponden al exón 13 y las letras en cursiva corresponden al intrón 13 de ambos receptores solubles

sVEGFR-1 y sVEGFR-2. La secuencia TAA es el codón de paro de la forma soluble de ambos receptores. En la figura 11 B se muestra la secuencia C-terminal de aminoácidos de los receptores solubles sVEGFR-1 y sVEGFR-2 en bovinos, humano y ratón. Las letras en cursivas corresponden a los aminoácidos codificados por secuencias del intron 13 sin procesar en la forma soluble de los receptores VEGFR-1 y 2.

A

>sVEGFR-1

**GGCACCTATGCCTGCCGAGCTAGGAACATATACACAGGGGAAGAAATCC
TCCAGAAGAAAGAAGTGATCATTAGAG***GTGAGCACTGCAACAAAAGGCTGT
TTTCTCTCGGATCTCCAAATTTAAAAGCACGAGGAATGATTGTACCGCACAAAATA
ATGTAAAACATTAAAGGACTCATTACCAAGTAACAGTTGTCTCATATCATCT
TGATTTATTG*

>sVEGFR-2

**TTGCAGGACCAAGGAGACTATGTCTGCTTTGCTCAGGACAGGAAGACTA
AGAAAAGACATTGTGTGGCCAGGCAGCTCACAGTCCTAG***GTAGGGCAGTC
ACTCTGGACCATCCAGAGGCAGTTGGGTTGCCTTCAATGTAATGCTTTCAGGGCC
CATGAGAAGATTGTCTTCTATGTGCTTATATATTAGACAGATGAGCTCATATCTGAC
TCACCAAA*

B

sVEGFR-1

Bovino: *GTYACRARNIYTGEEILQKKEVIIRGEHCNKKAVFSRISKFKSTRNDCTAQNNVKH.*

Humano: *GTYACRARNVYTGEEILQKKEITIRGEHCNKKAVFSRISKFKSTRNDCTTQSNVKH.*

Ratón: *GTYACRARNIYTGEDILRKTEVLVRGEHCGKKAIFSRISKFKSRRNDCTTQSHVKH.*

sVEGFR-2

Bovino: *LQDQGDYVCFAQDRKTKKRHCVARQLTVLGRAVTLDHPEAVGLPSM.*

Humano: *LQDQGDYVCLAQDRKTKKRHCVVRQLTVLGRETILDHCAEAVGMP.*

Ratón: *LQDQGDYVCSAQDKKTKKRHCLVKQLIILGMEASLGDRAMP.*

Figura 11. A. Secuencia de DNAC de sVEGFR-1 y 2 en células foliculares. B. Secuencia predicha de amino ácidos del C-terminal de sVEGFR-1 y 2 en bovino, humano y ratón.

La expresión del RNAm de sVEGFR-1 y sVEGFR-2 en células de folículos obtenidos los días 4, 6 y 9 del ciclo estral de bovinos, se puede observar en la Figura 12. El panel A muestra bandas de 187 pb correspondientes al gen 18s y de 68 pb que corresponden al amplicón diseñado para sVEGFR-1. En el panel B se observan las bandas que muestran el amplicón de sVEGFR-2 de 72 pb y el 18S de 187 pb.

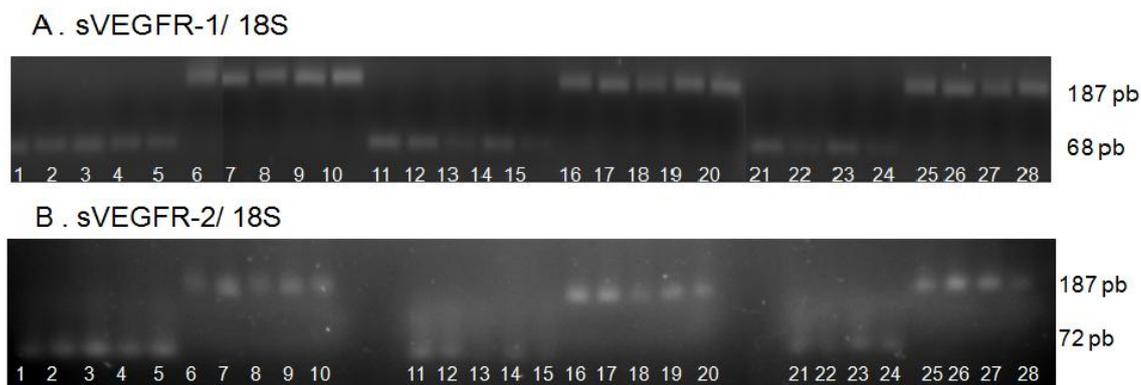


Figura 12. Gel de electroforesis de la RT-PCR de sVEGFR-1, sVEGFR-2 y 18s. En el panel A se observa a sVEGFR-1 de 68 pb en los carriles 1-5, 11-15, 21-24, que corresponden a los días 4, 6 y 9 del ciclo estral de bovino. El 18s de 187 pb se encuentra en los carriles 6-10, 16-20, 25-28. Para el caso del panel B los carriles 1-5, 11-15, 21-24, corresponden a sVEGFR-2 y los carriles 6-10, 16-20, 25-28 corresponden a 18S.

La abundancia relativa del RNAm de sVEGFR-1 y sVEGFR-2 en folículos dominantes del día 4, 6 y 9 del ciclo estral de bovinos se muestra en la Figura 13, donde en el panel 13 A se observa que la abundancia relativa del RNAm para VEGFR-1 disminuyó de forma significativa ($P < 0.001$) entre los día 4, 6 y 9 del ciclo (día 4=1.1262±0.050; día 6=0.9462±0.50; día 9=0.44075±0.056 respectivamente). En la Figura 13 B se puede ver que la abundancia relativa del RNAm para VEGFR-2 no es diferente entre el día 4 y 6 ($p=0.04$) y aumenta en folículos del día 9 del ciclo ($p=0.09$). (día 4=1.035±0.23, día 6=1.179±0.233 y día 9=1.826±0.26 respectivamente). La correlación entre ambos receptores, sVEGFR-1 y sVEGFR-2, es de -0.58.

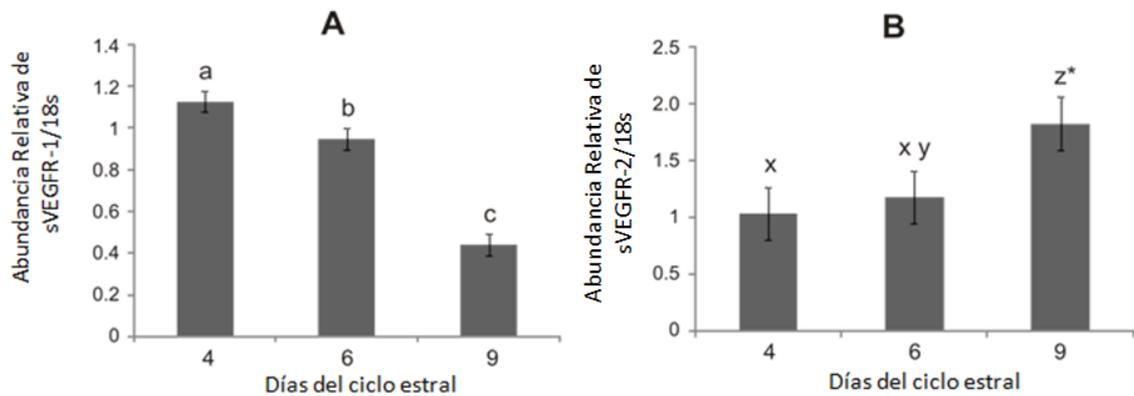


Figura 13. **A.** Abundancia relativa del RNAm del receptor sVEGFR-1 en folículos dominantes del día 4, 6 y 9 del ciclo estral de bovino. Letras diferentes representan diferencias significativas ($P \leq 0.0001$). **B.** Abundancia relativa del RNAm de sVEGFR-2 en folículos dominantes del día 4, 6 y 9 del ciclo estral de bovino. Letras diferentes significan diferencias significativas. Z * Mostró una tendencia a aumentar ($P=0.09$).

VIII. DISCUSIÓN

En este trabajo se demuestra por primera vez la presencia del RNAm de las formas solubles de los receptores 1 y 2 para el VEGF (sVEGFR-1 y sVEGFR-2) en folículos dominantes de bovino, de los días 4, 6 y 9 del ciclo estral. Adicionalmente, se mostraron así como las diferencias en el patrón de expresión de estos receptores en del día 4, 6 y 9 del ciclo estral

El RNAm de sVEGFR-1 se produce por un procesamiento alternativo del pre-RNAm de VEGFR-1 (Peterson *et al.*, 2002; Kondo *et al.*, 1998). La gran mayoría de los RNAm, en su extremo 3' tiene adiciones de secuencias de poliadenina de longitud variable (Robberson *et al.*, 1990). Dicha modificación tiene importantes implicaciones funcionales ya que la interacción entre los extremos 3' y 5' (también modificado post-transcripcionalmente) favorece el reclutamiento de dichos RNAm por el ribosoma, incrementando la eficacia de la traducción. Además, esta modificación tiene implicaciones en la estabilidad citoplasmática del RNAm y constituye, en sí misma, un mecanismo de regulación de la expresión génica en RNAm que disponen de más de un sitio

de poliadenilación. Aunque conceptualmente sencilla, la modificación del extremo 3' del RNAm es llevada a cabo por una maquinaria protéica comparable en complejidad a la de otros procesos nucleares como el "splicing" (eliminación de intrones) (Zheng, 2004). Organismos superiores y levaduras representan los dos modelos más generales de maquinarias de poliadenilación en los que juegan un papel fundamental los fenómenos de reconocimiento Proteína-RNA, en especial en la identificación y selección del sitio de poliadenilación para cada RNAm a lo largo de las diferentes etapas del ciclo celular (Zheng, 2004).

El RNAm de sVEGFR-1 es el resultado de un procesamiento alternativo del preRNAm del gen *flt-1* (VEGFR-1), en el cual el intrón 13 no se procesa como tal sino que pasa a formar parte del exón final del transcrito con secuencias de su parte proximal que son traducidas a proteína. (Kondo *et al.*, 1998). Según describen Huckle y Roche (2004) existen diferentes señales de poliadenilación dentro del intrón 13 del gen de ratón que son utilizadas para el procesamiento en 3' y poliadenilación del preRNAm, dando lugar a transcritos maduros de sVEGFR-1 que difieren en tamaño hasta 3.9 kb en su 3'UTR.

En animales mutados al eliminar la poliadenilación, se observa que disminuye la expresión del RNAm sVEGFR-1, junto con un aumento en el RNAm del receptor completo VEGFR-1, lo que sugiere que se lleva a cabo un mecanismo post-transcripcional en la producción de la proteínas de sVEGFR-1 y por lo tanto, en la modulación de la respuesta al VEGF. Este mecanismo de procesamiento alternativo en 3' parece ser generalizado en mamíferos; Tian *et al.* (2007) encontró que ~ 20% de los genes humanos tienen por lo menos un evento de poliadenilación intrónica que potencialmente puede dar lugar a variantes del RNAm, y el análisis cuantitativo indica que la actividad de poliadenilación intrónica puede variar bajo diferentes condiciones celulares para la mayoría de los genes, lo que concuerda con los resultados de Huckle y Roche (2004). El Intrón 13 del gen de VEGFR-1 en el ratón contiene 6 secuencias canónicas (AAUAAA) y 6 señales variantes de poliadenilación (AUUAAA), mientras que en la especie bovina hay 6 secuencias canónicas y 7

señales variantes y en humanos hay 4 secuencias canónicas y 6 señales variantes. La señal AUUAAA más proximal del extremo 5' del intrón se encuentra en la posición 91 y está conservada en las tres especies. Esta señal probablemente señala un evento de corte y poliadenilación previamente descrito en el ratón (He *et al.*, 1999). El resto de señales de poliadenilación están poco conservadas. Sin embargo existen dos señales solapantes (AUUAAAAUAAA) que están presentes en las 3 especies hacia el extremo 3' del intrón. Es interesante destacar que eventos de corte y poliadenilación que suceden corriente debajo de esta secuencia AAUAAA se utilizan preferentemente a otras señales activas según describen Huckle y Roche (2004). Varias de las 13 señales de poliadenilación presentes en el intrón 13 en la especie bovina podrían ser utilizadas para la poliadenilación en el extremo 3'; Huckle y Roche (2004) encontraron que al menos cuatro señales activas de poliadenilación fueron funcionales en transfectantes de ratón que portaban minigenes VEGFR-1.

De manera similar al caso de VEGFR-1, existen posibles señales de corte y poliadenilación en el intrón 13 del gen VEGFR-2. Hay tres señales de este tipo (una canónica y dos variantes) en el ratón, de las cuales la canónica, situada en la posición 1733, demostró ser funcional (Albuquerque *et al.*, 2009). En el bovino hay una sola señal canónica de poliadenilación en la posición 1396 en el intrón 13 del RNAm de VEGFR-2.

Los dos principales receptores de VEGF son VEGFR-1 y VEGFR-2, que regulan la actividad biológica de VEGF (Christie *et al.*, 2007). Aunque ambos receptores son proteínas transmembranales que se unen a VEGF con gran afinidad, VEGFR-2 parece ser el principal receptor de señalización de VEGF en células endoteliales. En cambio VEGFR-1 parece estar implicado en regular la cantidad de VEGF disponible para evitar unirse y activar a VEGFR-2 (Lam *et al.*, 2005; Christie *et al.*, 2007), y se ha visto que la pérdida de la expresión de VEGFR-1 se asocia a una mejor supervivencia de células endoteliales (Carmeliet *et al.*, 2000).

El receptor VEGFR-1 tiene una Kd de 10-20 pM, mientras que VEGFR-2, tiene una menor afinidad (Kd de 75–125 pM) (Ferrara, 2004). Después del procesamiento alternativo, los receptores solubles conservan su afinidad por el ligando, la Kd de sVEGFR-1 es 10-30 pM, y de sVEGFR-2 es de 75 -760 pM (Takahashi y Shibuya, 2005), por lo tanto estos receptores solubles pueden actuar como moduladores de la biodisponibilidad de VEGF (Kaczmarek *et al.*, 2009; Tripathi *et al.*, 2009). La expresión de RNAm de sVEGFR-1 fue descrita inicialmente 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 del RNAm de sVEGFR-1 ha sido localizada en endometrio y en el cuerpo lúteo de cerdas ciclando y gestantes (Kaczmarek *et al.*, 2009). A sVEGFR-1 se le atribuye un papel principal en la generación de patologías vasculares como la preclampsia o crecimiento retardado del útero (Gruemmer *et al.*, 2005).

En este trabajo demostramos la presencia del RNAm de los receptores sVEGFR-1 y sVEGFR-2 en folículos dominantes del día 4, día 6 y día 9 del ciclo estral de bovinos; la expresión de sVEGFR-1 fue menor en el día 9 a diferencia de los días 4 y 6, por el contrario la presencia de sVEGFR-2 fue más abundante en el día 9 que en los otros días del ciclo. Es probable que en los folículos dominantes del día 9, que cabe esperar que estén atrésicos, exista mayor expresión de sVEGFR-2, debido a que este receptor puede estar jugando un importante papel al unirse a VEGF y evitar que el ligando cumpla con su función citoprotectora en células de la granulosa. Greenaway *et al.*,(2004), han demostrado que VEGF ejerce un efecto citoprotector a través del VEGFR-2 en células de la granulosa y que la expresión de la proteína del VEGF y del VEGFR-2 en estas células se incrementa conforme aumenta el tamaño del folículo de >0.5 cm a 1 cm de diámetro. Así mismo, se ha escrito que conforme avanza el grado de atresia folicular, la expresión del VEGFR-2 disminuye (Greenaway *et al.*, 2004) y al no estar disponible VEGF disminuye la actividad de VEGFR-2 razón por la cual se puede producir atresia. La hipótesis del papel de los receptores solubles del VEGF en el proceso de atresia se ve apoyada por los resultados de los experimentos realizados *in vitro*, donde la

adición 30 ng / ml del inhibidor de VEGFR-2 (SU1498) a cultivos de células de granulosa, bloquea los efectos del VEGF como citoprotector (Greenaway *et al.*, 2004). La expresión de VEGF y VEGFR-2 protegen a las células de la granulosa de los bovinos de la muerte celular y por lo tanto a los folículos de la atresia. En los folículos sanos hay una baja incidencia de apoptosis asociada a la alta expresión de VEGFR-2 en células de la granulosa (Shimizu *et al.*, 2007b), de forma opuesta a lo que ocurre en los folículos atrésicos tempranos, donde hay un aumento en la muerte de las células de la granulosa por la reducción de VEGFR-2 (Greenaway *et al.*, 2004). La reducción en la muerte celular por VEGF parece estar mediada a través de la reducción en la expresión de la caspasa 3 activa.

Según algunos autores, VEGFR-2 es el principal receptor de señalización de VEGF en células endoteliales, mientras VEGFR-1 estaría implicado en regular la cantidad de VEGF libre disponible para unirse y activar la expresión de VEGFR-2 (Carmeliet *et al.*, 2000). Si los receptores solubles conservan la misma afinidad por el ligando como han afirmado varios autores (Wada *et al.*, 2009; Tripathi *et al.*, 2009; Albuquerque *et al.*, 2009; Gruemmer *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2007) entonces es claro entender por qué en nuestros resultados, mientras la expresión del RNAm de sVEGFR-1 está alta, la de sVEGFR-2, está baja y sólo cuando la expresión de sVEGFR-1 disminuye significativamente (día 9 del ciclo), es probable que deje suficiente ligando para estimular la mayor expresión de sVEGFR-2 y que este receptor pueda realizar su función antiangiogénica, como han mencionado otros autores (Tripathi *et al.*, 2009; Albuquerque *et al.*, 2009). , al impedir que VEGF se una al receptor de membrana VEGFR-2 y, además evitar la citoprotección que le brinda VEGF a las células de la granulosa (Greenaway *et al.* 2004). Trabajos en donde encuentran la presencia de los receptores solubles (sVEGFR-1 y sVEGFR-2) en otros sistemas biológicos, han demostrado que los receptores solubles tienen como función atrapar al ligando, evitando su acción angiogénica en células endoteliales, Sallinen *et al.*, (2009). En el presente trabajo el aumento del receptor sVEGFR-2 en el día 9 parece ser más importante en la regulación del VEGF en los folículos que se asume están atrésicos al no permitir que

actuó con el receptor de membrana VEGFR-2 y este no cumpla su función biológica.

Algunos autores han demostrado el efecto inhibitorio que tiene sVEGFR-1 sobre VEGF. Así, Hazzard *et al.*, (2002) y Xu *et al.*, (2005) administraron sVEGFR-1 intrafolicular de folículos preovulatorios de mono Rhesus, y observaron alteraciones en la ovulación y formación y desarrollo del cuerpo lúteo. En el presente trabajo la expresión de sVEGFR-1 disminuyó de manera significativa ($P=0.0001$) en folículos del día 9 del ciclo a diferencia de la expresión de sVEGFR-2 que aumentó en los folículos (día 9 del ciclo) y al parecer es más importante el aumento de sVEGFR-2 en el proceso de atresia que sufren estos folículos.

Otros estudios, sobre la función de VEGF y sus receptores de membrana como reguladores de la angiogénesis durante el desarrollo y regresión de cuerpo lúteo sugieren que VEGFR-2 es el principal regulador de los efectos de VEGF, ya que durante la formación del cuerpo lúteo, el receptor se incrementa, mientras que durante la regresión tanto VEGF como VEGFR-2 disminuyen, sin que se observen cambios en VEGFR-1 (Berisha *et al.*, 2000; Boonyaprakob *et al.*, 2003).

El RNAm de los receptores sVEGFR-1 y sVEGFR-2 no había sido detectado en células foliculares de bovino y en ninguna otra especie doméstica. La única evidencia de la expresión del RNAm de uno de estos dos receptores, el sVEGFR-1, ha sido reportada recientemente en cerdas. Se ha detectado el RNAm de sVEGFR-1 en el endometrio de cerdas gestantes, así como en el cuerpo lúteo de cerdas tanto gestantes, como vacías. , y se ha propuesto que sVEGFR-1 puede estar involucrado en la remodelación tisular y vascular que debe ocurrir en el endometrio para que se lleve a cabo la implantación (Kaczmarek *et al.*, 2009).

Estos receptores sVEGFR-1 y sVEGFR-2 surgen de los mismos genes VEGFR-1 y VEGFR-2, que tienen un mismo sitio para comenzar la transcripción, pero el transcrito primario del RNAm es procesado de forma

diferente en el extremo 3', dando lugar a los RNAm de sVEGFR-1 y sVEGFR-2 respectivamente (Albuquerque *et al.*, 2009). Los transcritos de VEGFR-1 y 2 contienen ambos 30 exones, y son traducidos a proteínas transmembranales (Terman *et al.*, 1992). El transcritos de sVEGFR-1 y 2 contiene únicamente los primeros 13 exones. En el presente trabajo identificamos que se retiene parte del intrón 13 en el bovino y de manera similar ocurre en el humano Albuquerque *et al.*, (2009) y el ratón, en donde también se mantiene parte del intron 13 de VEGFR-1 y 2 (Albuquerque *et al.*, 2009; Huckle y Roche, 2004). Estos receptores solubles, al igual que los otros dos receptores VEGFR-1 y VEGFR-2, compiten por el ligando VEGF, sin embargo la información actual sobre estos receptores aún es poca sobre la regulación natural de sVEGFR-1 y 2 (Kaczmarek *et al.*, 2005; Sela *et al.*, 2008).

En humanos es donde más trabajos se han publicado sobre la presencia de sVEGFR-1 y sus posibles funciones. Este receptor es secretado por la placenta y puesto a circular libremente durante el embarazo, donde se ha demostrado que el aumento en los niveles séricos de la proteína de sVEGFR-1 está relacionado con la presencia de preeclampsia (Gruemmer *et al.*, 2005). Se ha demostrado también que sVEGFR-2 está aumentado en la placenta y en el suero de estas mujeres con preeclampsia (Tsatsaris *et al.*, 2003). También se han observado concentraciones disminuidas de las fracciones circulantes libres de VEGF durante el cuadro clínico de preeclampsia y antes de su aparición (Taylor *et al.*, 2003). La administración exógena de sVEGFR-1 a ratas gestantes induce hipertensión arterial, proteinuria y endoteliosis glomerular (Maynard *et al.*, 2003). En mujeres gestantes normales, la concentración de sVEGFR-1 es estable antes del tercer trimestre de gestación y aumenta en forma constante desde la semana 33 a 36. Este aumento corresponde a una disminución en el tercer trimestre de la concentración libre de VEGF en el embarazo normal (Levine *et al.*, 2004). Durante el segundo trimestre, las concentraciones de VEGF están elevadas y la concentración de sVEGFR-1 es baja, creando un estado proangiogénico. Se especula que en el tercer trimestre, el crecimiento vascular placentario puede ser detenido por un aumento de sVEGFR-1 antiangiogénico y la disminución de las

concentraciones de VEGF. En las mujeres con preeclampsia el sVEGFR-1 parece que aumenta temprano en la gestación alcanzando niveles más altos que en mujeres que no presentan problemas de preeclampsia (Levine *et al.*, 2004). A este receptor no se le atribuye únicamente un efecto negativo en fisiopatologías de mujeres gestantes sino también en patologías de córnea y síndrome de hiperestimulación ovárica (OHSS) (Thomas *et al.*, 2007). Se ha observado que los niveles séricos de VEGF aumentan luego de la administración de hCG en mujeres hiperestimuladas con riesgo a desarrollar OHSS (Yamamoto *et al.* 1997; Pellicer *et al.* 1999; Wang *et al.* 2002). Además, que las concentraciones de VEGF en suero, fluido peritoneal y folicular en pacientes con riesgo a OHSS se encuentran correlacionadas positivamente con el desarrollo del síndrome (Abramov *et al.* 1997; Artini *et al.* 1998; Agrawal *et al.* 1999). Varios autores han mostrado que el VEGF de pacientes con OHSS proviene de un ovario hiperestimulado debido a que la concentración de VEGF en fluido folicular es 100 veces mayor comparado al del suero (Agrawal *et al.* 1999; Artini *et al.* 1998). Por otro lado, estudios *in vitro* han demostrado que la administración de hCG en células de la granulosa luteinizadas humanas aumenta los niveles del RNAm de VEGF de manera dosis y tiempo dependiente. (Soares *et al.* 2008). Estos estudios han demostrado que el exceso de sVEGFR-1 está relacionado con la pobre respuesta a protocolos de gonadotropinas debido a la menor disponibilidad de VEGF mas que al exceso de la expresión de VEGF o su receptor VEGFR-2 Neulen *et al.*, (2001) ya que sVEGFR-1 secuestra a VEGF y no permite la angiogénesis fisiológica en el ovario esto fue demostrado por Ferrara *et al.*, (1998), que observaron que el tratamiento con receptores truncados (sVEGFR-1) llevó a una disminución de la angiogénesis del cuerpo lúteo en rata.

Los trabajos relacionados con el receptor soluble sVEGFR-2 son escasos y controversiales. En lo publicado hasta ahora, lo único aparentemente claro es que juega un papel antiangiogénico en córnea y suero de mujeres con preeclampsia (Tripathi *et al.*, 2009; Albuquerque *et al.*, 2009; Kikuchi *et al.*, 2011). En trabajos recientes se menciona que no hubo diferencia significativa en la concentración de sVEGFR-2 en suero de mujeres gestantes sanas y no

gestantes, sin embargo los niveles séricos de este receptor se vieron disminuidos en mujeres gestantes con preeclampsia (Chaiworapongsa *et al.* 2010), en relación a las mujeres gestantes sanas, estos cambios se acompañaron de la reducción significativa de inmunorreactividad a VEGFR-2 en células endoteliales y células de Houfbauer placentarias de mujeres con preeclampsia con más de 34 semanas de gestación. Es decir, la expresión disminuida de VEGFR-2 en células endoteliales y de Houfbauer en mujeres con preeclampsia disminuye las funciones de VEGF en el desarrollo placentario y explica la disminución de VEGFR-2 y sVEGFR-1 en la preeclampsia por la poca disponibilidad de VEGF en células endoteliales, lo que no estimula la presencia del receptor (Tripathi *et al.*, 2009). Con el trabajo realizado por Tripathi *et al.*, (2009) se podría pensar que en los folículos las cantidades de sVEGFR-2 al verse aumentadas impedirían la actividad de VEGF para unirse a VEGFR-2, que es el receptor con mayor actividad biológica y al que se le atribuyen efectos citoprotectores en células de la granulosa, por lo que al estar aumentado el sVEGFR-2 en los folículos probablemente éstos empezarían a sufrir un proceso de atresia por la baja interacción entre VEGF y VEGFR-2.

IX. CONCLUSIONES

Los folículos dominantes del día 4, 6 y 9 en bovinos expresan el RNAm de sVEGFR-1 y sVEGFR-2.

El procesamiento del preRNAm de los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 por procesamiento 3' y poliadenilación alternativos para producir sVEGFR-1 y sVEGFR-2 ocurre en el bovino en el mismo intrón que en humanos, cerdas y ratones: el intrón 13.

El patrón de expresión del RNAm de sVEGFR-1 y sVEGFR-2 se modificó de acuerdo al día del ciclo en el cual se obtuvieron los folículos dominantes.

Los folículos del día 4 y 6 tuvieron una alta expresión de RNAm de sVEGFR-1 y una baja expresión del RNAm de sVEGFR-2, en tanto que los folículos del día 9 del ciclo, presumiblemente atrésicos, mostraron la más baja expresión de RNAm de sVEGFR-1 y la más alta expresión de RNAm de sVEGFR-2. Por lo anterior, se puede decir que la relación baja expresión del RNAm de sVEGFR-1 y alta expresión de sVEGFR-2 ejercen efecto atresiogénico en los folículos dominantes del bovino.

X. REFERENCIAS

- Adams, GP; Jaiswal, R; Singh; Malhi, P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*. 2008; 69: 72–80
- Adams GP. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *J Reprod Fertil Suppl*. 1999; 54:17–32.
- Adams GP. Control of ovarian follicular wave dynamics in mature and prepubertal cattle for synchronization and superstimulation. In: *Proceedings of the XX congress of the world association for buiatrics*. 1998; 2: 595–605.
- Albuquerque R J, Hayashi T, Cho WG, Kleinman ME, Dridi S, Takeda A, Baffi JZ, Yamada K, Kaneko H, Green MG, Chappell J, Wilting J, Weich HA, Yamagami S, Amano S, Mizuki N, Alexander JS, Peterson ML, Brekken RA, Hirashima M, Capoor S, Usui T, Ambati BK, Ambati J. Alternatively spliced vascular endothelial growth factor receptor-2 is an essential endogenous inhibitor of lymphatic vessel growth. *Nat Med*. 2009;15: 1023-1030.
- Abedi H, Zachary I. Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. *J Biol Chem*. 1997;272:15442–15451.
- Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med*. 1995;1:1024–1028.
- Alonso-Pozos I, Rosales-Torres AM, Avalos R, and Vergara-Onofre M. Mechanism of granulosa cell death during follicular atresia depends on follicular size. *Theriogenology*. 2003; 60:1071-1081.
- Ahmad, S. y Ahmed, A. Antiangiogenic effect of soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in placental angiogenesis. *Endothelium*. 2005; 12:89-95.
- Bao B, 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 T, Spinaci M, Bacci ML, Forni M, Mattioli M. Vascular endothelial growth factor production in growing pig antral follicles. *Biol. Reprod*. 2000;63: 858-864.
- Ben Av P, Crofford LJ, Wilder RL y Hla T. Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and

interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Lett.* 1995; 372: 83-87.

Banks, BA. Multiple courses of antenatal corticosteroids and outcome of premature neonates. North American Thyrotropin-Releasing Hormone Study Group. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1998; 181: 709-717

Beaudoing E, Freier S, Wyatt JR, Claverie JM and Gautheret D. Patterns of variant polyadenylation signal usage in human genes. *Genome Res.* 2000; 10: 1001-1010.

Berisha B, Schams D, Kosmann M, Amselgruber W, Einspanier R.. Expression and tissue concentration of vascular endothelial growth factor, its receptors and localization in the bovine corpus luteum during estrous cycle. *Biol Reprod.* 2000; 63: 1106-1114.

Berisha B, Steffl M, Welter H, Kliem H, Meyer HH, Schams D, 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. *Reprod Fertil Dev.* 2008;20:258-268.

Bradbury MB. The structure and function of the blood–brain barrier. *Fed Proc.* 1984;43:186–190.

Bussolati, B. *et al.* Vascular endothelial growth factor receptor-1 modulates vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis via nitric oxide. *Am. J. Pathol.* 2001;159, 993-1008.

Bullough WS. Mitotic activity in the adult female mouse, *Mus musculus* L. A study of its relation to the oestrous cycle in normal and abnormal conditions. *Philos Trans R Soc Lond Ser B: Biol Sci.* 1946; 231:453–516.

Caramelo C, Alvarez-Arroyo MV, Yague S, Suzuki Y, Castilla MA, Velasco L, Gonzalez-Pacheco FR, Tejedor A. Cyclosporin A toxicity, and more: vascular endothelial growth factor (VEGF) steps forward. *Nephrol Dial Transplant.* 2004; 19(2):285-288.

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W and Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature.* 1996; 380: 435-439.

Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 2000; 6(4):389-395.

Chaiworapongsa T, Romero R, Tarca Kusanovic, J P, Gotsch F, Mittal P, Kim S K, Vaisbuch E, Mazaki-Tovi Sh, Erez O, Dong Z, Jai Kim Ch, Yeo L, Hassan S. A decrease in maternal plasma concentrations of sVEGFR-2 precedes the clinical diagnosis of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2010; 202:550.e1-10.

Cheung CY, Singh M, Ebaugh MJ, Brace RA. Vascular endothelial growth factor gene expression in ovine placenta and fetal membranes. *American Journal of Obstetrics Gynecology.* 1995;173 753-759.

Chomczynski, P. and Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987; 162: 156-159.

Christenson LK y Stouffer RL. Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin stimulation of vascular endothelial growth factor production by macaque granulosa cells from pre- and periovulatory follicles. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 1997; 82 (21):35-2142.

Clauss M, Gerlach M, Gerlach H *et al.* Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med* 1990;172:1535–1545.

Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G y Levi BZ. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J.Biol.Chem.* 1996; 271: 736-741.

Chun SY and Hsueh AJ. Paracrine mechanisms of ovarian follicle apoptosis. *J Reprod.Immunol.* 1998; 39: 63-75.

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

Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC y Yancopoulos GD. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell.* 1996; 87: 1161-1169.

Davis JS, Rueda BR, Spanel-Borowski K. Microvascular endothelial cells of the corpus luteum. *Reprod BiolEndocrinol.* 2003;1:89

De Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams Basic fibroblast growth factor upregulates the expression of vascular LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. *Circula- growth factor. Science.* 1994;255:989–991.

- De Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*. 1992; 255(5047):989-991.
- Dor Y, Porat R y Keshet E. Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am.J.Physiol Cell Physiol*. 2001; 280 C1367-C1374.
- Dvorak HF. Angiogenesis: update *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2005; 3: 1835–1842.
- Ebos JM, Bocci G, Man S, Thorpe PE, Hicklin DJ, Zhou D, Jia X, Kerbel RS. A naturally occurring soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 2 detected in mouse and human plasma. *Mol Cancer Res*. 2004; 2:315-326.
- Edmonds MA. History of poly A sequences: from formation to factors to function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2002; 71, 285-389.
- Elkin M, Orgel A, and Kleinman HK. An angiogenic switch in breast cancer involves estrogen and soluble vascular endothelial growth factor receptor 1. *J Natl Cancer Inst*. 2004; 96: 875-878.
- Esser S, Wolburg K, Wolburg H, Breier G, Kurzchalia T, Risau W. Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J Cell Biol* 1998;140:947–959.
- 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.
- Ferrara N and Davis-Smyth T. The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor. *Endocrine Reviews*. 1997; 18: 4-25
- Ferrara N, Keyt B. Vascular endothelial growth factor. Basic biology and clinical implications. In: Rosen E, Goldberg ID (eds) *Regulation of Angiogenesis*. Springer Verlag, New York, 1997; 209–232
- Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, Chisholm V, Hillan KJ, Schwall RH. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nature Med*. 1998; 4:336-340.
- Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol* 2002; 29: 10-14
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J: The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9(6): 669-676

- Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney International*. 1999; 56: 794-814.
- Ferrara, N. 2004. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. *Endocrine Reviews* 25: 581–611.
- 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.
- Frendewey D and Keller W. Stepwise assembly of a pre-mRNA splicing complex requires U-snRNPs and specific intron sequences. *Cell*. 1985; 42, 355-367.
- Foghi AR, 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*. 1998; 139(4): 2041-2047.
- Folkman J and Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science*. 1987; 235: 442-447.
- Fortune JE, Rivera MG, Evans ACO, Turzillo AM. Differentiation of Dominant versus Subordinate Follicles in Cattle. *Biol of Reprod*. 2001; 65: 648–654.
- Fortune JE. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci*. 2003;1578(3-4): 135-63.
- Fortune JE, Rivera MG, Yang MY. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Animal Reproduction Sci*. 2004; 82-83:109-126.
- Froment, P. Fabre S, Dupont J, Pisselet C, Chesneau D, Staels B and Monget P. Expression and Functional Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-g in Ovarian Folliculogenesis in the Sheep. *Biology of Reproduction*. 2003; 69: 1665–1674.
- Fraser HM y Wulff C. Angiogenesis in the corpus luteum. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2006; 1: 1 – 8.
- Fujio Y y Walsh K. Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage-dependent manner. *J Biol Chem*. 1999; 274: 16349-16354.
- Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D, Carbone DP. Production of vascular endothelial growth factor by

human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 1996. 2(10):1096-1103.

García I; Martínez L; Chavarría G; Zamora C, Alvarez M; Agredano M; Moncayo J; Segura ML. *Biología celular del splicing. Mensaje bioquímico*. 2007. Vol. XXXI.

Gerber HP, Condorelli F, Park J. y Ferrara N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 1997; 19:272, 23659-23667

Gerber HP, Dixit V y Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J.Biol Chem.* 1998a; 273: 13313-13316.

Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V y Ferrara N. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J.Biol Chem.* 1998b; 273; 30336-30343.

Gerber HP, Malik AK, Solar GP, Sherman D, Liang XH, Meng G, Hong K, Marsters JC, Ferrara N. VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature*. 2002; 417(6892):954-958.

Guidi AJ, Abu-Jawdeh G, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Dvorak HF, Brown LF. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 1995; 87:12137–12145

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.

Grasselli F. Bianco F, Basini G, Santini S. Angiogenic activity of swine granulose cells: effects of hypoxia and the role of VEGF. *Veterinary Research Communications*. 2003; 29: 157-159.

Greenaway J, Gentry PA, Feige JJ, LaMarre J, Petrik JJ. Thrombospondin and Vascular Endothelial Growth Factor Are Cyclically Expressed in an Inverse Pattern During Bovine Ovarian Follicle Development. *Biology of Reproduction* 72:1071–1078. *J. Anim. Sci.* 2004; 85: 1914-1922.

Greenaway J, Gentry PA, Feige JJ, LaMarre J, Petrik JJ. Thrombospondin and vascular endothelial growth factor are cyclically expressed in an inverse pattern during bovine ovarian follicle development. *Biol Reprod.* 2005;72:1071-1078.

Gordon J.D., Mesiano S, Zaloudsek CJ, Jaffe RB. Vascular endothelial growth factor localization in human ovary and fallopian tubes: possible role in reproductive function and ovarian cyst formation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996; 81:353-9.

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. *Reprod Biol and Endocri.* 2005; 3: 57-64.

Gille J, Reisinger K, Westphal-Varghese B and Kaufmann R. Decreased mRNA stability as a mechanism of glucocorticoid-mediated inhibition of vascular endothelial growth factor gene expression by cultured keratinocytes. *J. Invest Dermatol.* 2001; 117, 1581-1587.

Goldman CK, Kendall RL, Cabrera G, Soroceanu L, Heike Y, Gillespie GY, Siegal GP, Mao X, Bett AJ, Huckle WR. Paracrine expression of a native soluble vascular endothelial growth factor receptor inhibits tumor growth, metastasis, and mortality rate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95: 8795-8800.

Guo D, Jia Q, Song HY, Warren RS, Donner DB. Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation. *J Biol Chem* 1995; 270(12):6729-6733.

Guerrin M, Moukadir H, Chollet P, Moro F, Dutt K, Malecaze F, Plouet J. Vasculotropin/vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor for human retinal pigment epithelial cells cultured in vitro. *Journal Cellular Physiology.* 1995; 164: 385-394.

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

Hasumi Y, Mizukami H, Urabe M, Kohno T, Takeuchi K, Kume A, Momoeda M, Yoshikawa H, Tsuruo T, Shibuya M. Soluble FLT-1 expression suppresses carcinomatous ascites in nude mice bearing ovarian cancer. *Cancer Res.* 2002; 62: 2019-2023.

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.

Hazzard TM, Christenson LK, Stouffer RL. Changes in expression of vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 and -2 in the macaque corpus luteum during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 2000;6:993-8

Hanahan D and Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100: 57-70.

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.

He, Y., Smith, S. K., Day, K. A., Clark, D. E., Licence, D. R., Charnock-Jones D. S. Alternative splicing of vascular endothelial growth factor (VEGF)-R1 (FLT-1) pre-mRNA is important for the regulation of VEGF activity. *Mol Endocrinol*. 1999; 13: 537–545.

Henao R; Trujillo A. Establecimiento y desarrollo de la dominancia folicular bovina. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 2000; 13(2): 108-120.

Hellmut G y Augustin PD. Vascular morphogenesis in the ovary. *Bailliere's Clinical Obstetric and Gynecology*. 2000; 14: 867-882.

Huckle, W. R. and Roche, R. I. Post-transcriptional control of expression of sflt-1, an endogenous inhibitor of vascular endothelial growth factor. *J. Cell. Biochem*. 2004; 93: 120–132.

Hsueh AJ, Billig H, Tsafri A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev*. 1997; 15:707-24.

Ilic D, Almeida EA, Schlaepfer DD, Dazin P, Aizawa S, Damsky CH. Extracellular matrix survival signals transduced by focal pathadhesion kinase suppress p53-mediated apoptosis. *J Cell Biol* 1998;143:547–560.

Ikeda, E., Achen, M. G., Breier, G. y Risau, W. Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J. Biol. Chem*. 1995; 270: 19761-19766.

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.

Jia H, Jezequel S, Lohr M, Shaikh S, Davis D, Soker S, Selwood D, Zachary I. Peptides encoded by exon 6 of VEGF inhibit endothelial cell biological responses and angiogenesis induced by VEGF. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 2001; 283:164-173

Jiang JY, Macchiarelli G, Tsang BK, Sato E. Capillary angiogenesis and degeneration in bovine ovarian antral follicles. *Reproduction.* 2003;125:211-23.

Kaczmarek, M. M., Schams D., Ziecik A. J. Role of vascular endothelial growth factor in ovaries physiology- an overview. *Reprod. Biol.* 2005; 5: 111-136.

Kaczmarek, M. M., Kiewisz, J., Schams, D. And Ziecik, A. J. 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.

Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(22):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.

Knight, P and Glister, C. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction.* 2006; 132: 191–206

Klagsbrun M y D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.*1996; 7: 259-270.

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.

Kremer C, Breier G, Risau W, Plate KH. Up-regulation of flk-1/vascular endothelial growth factor receptor 2 by its ligand in a cerebral slice culture system. *Cancer Res.* 1997; 3852-59.

Krussel JS. Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA splice variants are differentially expressed in human blastocysts. *Mol. Hum. Reprod.* 2001; 7: 57-63

Krussel JS, Casan EM, Raga F, Hirchenhain J, Wen Y, Huang HY, Bielfeld P, and Polan ML. Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor

transmembraneous receptors Flt1 and KDR, and the soluble receptor sflt in cycling human endometrium. *Mol Hum Reprod*. 1999; 5: 452-458.

Kondo K, Hiratsuka S, Subbalakshmi E, Matsushime H, Shibuya M. Genomic organization of the flt-1 gene encoding for vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-1 suggests an intimate evolutionary relationship between the 7-Ig and the 5-Ig tyrosine kinase receptors. *Gene*. 1998; 208: 297-305.

Kikuchi S; Obata Y; Yagyu K; Lin Y; Nakajima T; Kobayashi O; Kikuichi M, Ushijima R; Kurosawa M y Ueda J. Reduced serum vascular endothelial growth factor receptor-2 (sVEGFR-2) and sVEGFR-1 levels in gastric cancer patients. *Japanese Cancer Association*. 2011; 10(1111):1349-7006.

Kulick LJ, Kot K, Wiltbank MC, Ginther OJ, Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. *Theriogenology*. 1999; 52: 913-921.

Lam C, Lim K-H, and Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia. *Hypertension*. 2005; 46: 1077-1085.

Lamb, G.C., M.F. Smith, G.A. Perry, J.A. Atkins, M.E. Risley, D.C. Busch, and D.J. Patterson. 2009. *Reproductive Endocrinology and Hormonal Control of the Estrous Cycle*. North Florida Research and Education Center, University of Florida.

Lamoreaux WJ, Fitzgerald ME, Reiner A, Hasty KA, Charles S. Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro. *Microvasc Res* 1998;55:29-42.

LeCouter J, Moritz DR, Li B, Phillips GL, Liang XH, Gerber HP, Hillan KJ, Ferrara N. Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science*. 2003; 299: 890-893.

Levy, A. P., Levy, N. S., Wegner, S. y Goldberg, M. A. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J. Biol. Chem*. 1995; 270: 13333-13340.

Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim K. H, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, and Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N. Engl J Med*. 2004; 350:672-683.

Lewin, B. *Genes IX*. Jones and Bartlett, Boston. 2008.

Lewin. *Genes VII*. Oxford University Press. 2000.

Li J, Brown LF, Hibberd MG, Grossman JD, Morgan JP, Simons M. VEGF, flk-1, and flt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. *Am J Physiol.* 1996; 270(5 Pt 2):H1803-H1811.

Liu ZY, Ganju RK, Wang JF. Characterization of signal transduction pathways in human bone marrow endothelial cells. *Blood* 1997;90:2253–2259.

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

Miquerol L, Langille BL y Nagy A. Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. *Development.* 2000;127: 3941-3946.

Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, and Karumanchi SA. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest.* 2003. 111:649–658.

Matsumoto Y, Tanaka K, Hirata G, Hanada M, Matsuda S, Shuto T, Iwamoto Y. Possible involvement of the vascular endothelial growth factor-Flt-1-focal adhesion kinase pathway in chemotaxis and the cell proliferation of osteoclast precursor cells in arthritic joints. *J Immunol.* 2002; 168:5824–5831.

Mattioli M, Barboni B, Turriani M, Galeati G, Zannoni A, Castellani G, Berardinelli P. and Scapolo, P.A. Follicle activation involves vascular endothelial growth factor production and increased blood vessel extension. *Biol. Reprod.* 2001; 65:1014-1019.

Melvin EJ, Lindsey BR, Quintal-Franco J, Zanella E, Fike KE, Van Tassell CP, Kinder JE. Circulating concentrations of estradiol, luteinizing hormone, and follicle-stimulating hormone during waves of ovarian follicular development in prepubertal cattle. *Biol Reprod* 1999; 60:405– 412.

Minvielle-Sebastia, L., and Keller, W. mRNA polyadenylation and its coupling to other RNA processing reactions and to transcription. *Curr Opin Cell Biol.* 1999; 11: 352-357.

Miquerol L., Langille, B. L. and Nagy, A. Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. *Development.* 2000;127: 3941–3946

Morishita K, Johnson DE, Williams LT. A Novel promoter for vascular endothelial growth factor receptor (flt-1) that confers endothelial-specific gene expression. *J Biol Chem* 1995;270:27948-53.

- Mueller MD, Vigne JL, Minchenko A, Lebovic DI, Leitman DC y Taylor RN. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors alpha and beta. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2000; 97: 10972-10977.
- Mueller MD, Vigne JL, Pritts EA, Chao V, Dreher E y Taylor RN. Progestins activate vascular endothelial growth factor gene transcription in endometrial adenocarcinoma cells. *Fertil.Steril.* 2003; 79: 386-392.
- Murdoch WJ, Wilken C and Young DA. Sequence of apoptosis and inflammatory necrosis within the formative ovulatory site of sheep follicles. *J. Reprod. Fertil.* 1992;117: 325 – 329.
- Mura, M., dos Santos, C. C., Stewart, D. & Liu, M. Vascular endothelial growth factor and related molecules in acute lung injury. *J. Appl. Physiol.* 2004;97: 1605-1617.
- Ng YS, Krilleke D and Shima DT. VEGF function in vascular pathogenesis. *Experimental Cell Research.* 2006; 312: 527-537.
- Neufeld G., Cohen T, Shraga N, Lange T, Kessler O and Herzog Y. The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis. *Trends Cardiovasc. Med.* 2002; 12: 13–19.
- Neulen J, Wenzel D, Hornig C, Wunsch E, Weissenborn U, Grunwald K, Buttner R, Weich H. Poor responder-high responder: the importance of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 in ovarian stimulation protocols. *Hum Reprod.* 2001;16:621–626. doi: 10.1093/humrep/16.4.621.
- Nowak DG, Woolard J, Mohamed AE, Konopatskaya O, Saleem MA, Churchill AJ, Lodomery MR, Harper SJ, Bates DO. Expression of pro-and anti-angiogenic isoforms of VEGF is diferentially regulated by splicing and growth factors. *J. Cell Sci.* 2008; 15(121):3487-3495.
- Oberg-Welsh C, Sandler S, Andersson A, Welsh M. Effects of vascular endothelial growth factor on pancreatic duct cell replication and the insulin production of fetal islet-like cell clusters in vitro. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 1997;126: 125-132.
- Olson TA, Mohanraj D, Carson LF, Ramakrishnan S. Vascular permeability factor gene expression in normal and neoplastic human ovaries. *Cancer Res.* 1994; 54:276–280

Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling – in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006. 7(5):359-371.

Olofsson B, Korpelainen E, Pepper MS, Mandriota SJ, Aase K, Kumar V, Gunji Y, Jeltsch MM, Shibuya M, Alitalo K, Eriksson U. Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998. 95(20):11709-11714.

Park J, Keller G-A, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 1993; 4: 1317–26.

Papaioannou, A. I., Kostikas, K., Kollia, P. & Gourgoulianis, K. I. Clinical implications for vascular endothelial growth factor in the lung: friend or foe *Respir. Res.* 2006; 7:128-128.

Parborell F, Irusta G, Vitale AM, Gonzalez O, Pecci A and Tesone M. GnRH antagonist Antide inhibits apoptosis of preovulatory follicle cells in rat ovary. *Biol Repr.* 2005; 72: 659-666.

Parborell F, Pecci A, Gonzalez O, Vitale A and Tesone M. Effects of a gonadotropin-releasing hormone agonist on rat ovarian follicle apoptosis: Regulation by EGF and the expression of Bcl-2-related genes. *Biol.Reprod.* 2002; 67: 481-486.

Partanen TA, Paavonen K: Lymphatic versus blood vascular endothelial growth factors and receptors in humans. *Microsc Res Tech* 2001, 55: 108-121.

Patterson C, Perrella MA, Hsieh CM, Yoshizumi M, Lee ME, Haber E. Cloning and functional analysis of the promoter for KDR/flk-1, a receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1995; 270:23111-18.

Pau E, Alonso-Muriel I, Gomez R, Novella E, Ruiz A, Garcia-Velasco JA, Simon C, and Pellicer A. Plasma levels of soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 may determine the onset of early and late ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod.* 2006; 21:1453–1460.

Penotti, F. E. Human pre-mRNA splicing signals. *J Theor Biol.* 1991;150: 385-420.

Peterson, M. L., Bertolino, S., and Davis, F. An RNA polymerase pause site is associated with the immunoglobulin mus poly(A) site. *Mol Cell Biol.* 2002; 22: 5606-5615.

Rajakumar A, Michael HM, Rajakumar PA, Shibata E, Hubel CA, Karumanchi SA, Thadhani R, Wolf M, Harger G, and Markovic N. Extra-placental expression of vascular endothelial growth factor receptor-1, (Flt-1) and soluble Flt-1 (sFlt-1), by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in normotensive and preeclamptic pregnant women. *Placenta*. 2005; 26: 563-573.

Rajakoski E. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical, and left-right variations. *Acta Endocrinol* 1960;34:7-68.

Redmer DA, Doraiswamy V, Bortnem BJ, Fisher K, Jablonka-Shariff A, Grazul-Bilska AT y Reynolds LP Evidence for a role of capillary pericytes in vascular growth of the developing ovine corpus luteum. *Biol Reprod*. 2001;65: 879-889.

Redmer DA y Reynolds LP Angiogenesis in the ovary. *Rev.Reprod*. 1996;1: 182-192.

Reed R, and Palandjian L. Spliceosome assembly. In *Eukaryotic mRNA Processing*, A. R. Krainer, ed. Oxford, IRL Press. 1997;103-129.

Reynolds LP, Grazul-Bilska AT, Killilea SD y Redmer DA Mitogenic factors of corpora lutea. *Prog.Growth Factor Res*. 1994; 5: 159-175.

Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997;386:671-674.

Rivera MG y Fortune EJ. Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins -4 and -5 bovine follicular fluid: Implications for ovarian follicular selection and dominance. *Endocrinol*. 2003; 144(7): 2977-2987.

Roberts WG, Palade GE. Neovasculature induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated. *Cancer Res* 1997;57:765-772.

Roberts, W. G. y Palade, G. E. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J. Cell Sci*. 1995;108: 2369- 2379.

Robberson, B. L., Cote, G. J., and Berget, S. M. Exon definition may facilitate splice site selection in RNAs with multiple exons. *Mol Cell Biol*. 1990; 10: 84-94.

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.

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-Torres A.M; Alonzo, I; Vergara, M; Romano, M; Castillo-Júarez, H; Ávalos, A; Rosado, A; Gutiérrez, C.G. Vascular endothelial growth factor isoforms 120, 164 and 205 are reduced with atresia in ovarian follicles of sheep. *Animal Reproduction Science*. 2010; 122: 111-117.

Rosales AM. Atresia Follicular. Ed. Javier López Moctezuma. *Biología de la Reproducción*. 1998.

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

Rota R, Riccioni T, Zaccarini M, Lamartina S, Gallo AD, Fusco A, Kovesdi I, Balestrazzi E, Abeni DC, Ali RR, and Capogrossi MC. Marked inhibition of retinal neovascularization in rats following soluble-flt-1 gene transfer. *J Gene Med*. 2004; 6: 992-1002.

Sela S, Itin S, Natanson-Yaron S, Greenfield C, Goldman- Wohl D, Yagel S, 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. *Circ Res*. 2008; 102: 1566-1574.

Senger DR, Connolly DT, Van de WL, Feder J, Dvorak HF. Purification and NH₂- terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res* 1990. 50(6):1774-1778.

Shen, B. Q. *et al*. Homologous up-regulation of KDR/Flk-1 receptor expression by vascular endothelial growth factor in vitro. *J. Biol. Chem*. 1998; 273, 29979-29985.

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

Shimizu T, Jiang Jin-Yi, Lijima K, Miyabayashi K, Ogawa Y, Sasada H, 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*. 2003; 69: 1388-1393.

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.

Singh J, Adams GP, Pierson RA. Promise of new imaging technologies for assessing ovarian function. *Anim Reprod Sci* 2003;78:371–99.

Shibuya M: Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct* 2001, 26: 25-35

Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushime H, Sato M. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase (flt) closely related to the fms family. *Oncogene*. 1990; 8:519–527.

Shibuya, M. Vascular endothelial growth factor-dependent and independent regulation of angiogenesis. *BMB reports*. 2008.

Shifren JL, Mesiano S, Taylor RN, Ferrara N y Jaffe RB. Corticotropin regulates vascular endothelial growth factor expression in human fetal adrenal cortical cells. *J.Clin.Endocrinol.Metab*. 1998; 83: 1342-1347.

Soh EY, Sobhi SA, Wong MG, Meng YG, Siperstein AE, Clark OH y Duh QY. Thyroid-stimulating hormone promotes the secretion of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cell lines. *Surgery*. 1996; 120: 944-947.

Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *Journal of Neuroscience*. 1999; 19: 5731-5740.

Stewart RJ, Panigrahy D, Flynn E y Folkman J. Vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis are regulated by androgens in hormone responsive human prostate carcinoma: evidence for androgen dependent destabilization of vascular endothelial growth factor transcripts. *J.Urol*. 2001;165: 688-693.

Stouffer RL, Martinez-Chequer JC, Molskness TA, Xu F y Hazzard TM. Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. *Arch.Med.Res*. 2001;32: 567-575.

Takashi H y Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clinical Science*. 2005;109: 227-241.

Tamanini C y De Ambrogi M. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reprod.Domest.Anim*. 2004; 39 206-216.

Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Bohlen P. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992. 187(3):1579-1586.

Thakker GD, Hajjar DP, Muller WA, Rosengart TK. The role of phosphatidylinositol 39-kinase in vascular endothelial growth factor signaling. *J Biol Chem* 1999;274:10002–10007.

Thomas, C.P., Andrews, J.I., Liu, K.Z. Intronic polyadenylation signal sequences and alternate splicing generate human soluble Flt1 variants and regulate the abundance of soluble Flt1 in the placenta. *FASEB J*. 2007; 21: 3885–3895.

Tian B, Pan Z and Lee JY. Widespread mRNA polyadenylation events in introns indicate dynamic interplay between polyadenylation and splicing. *Genome Res*. 2007; 17: 156-165.

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

Tran J, Rak J, Sheehan C Dumont DJ. Marked induction of the IAP antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 264:781–788.

Tran J, Master Z, Yu JL, Rak J, Dumont DJ y Kerbel RS. A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. 2002;99: 4349-4354.

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.

Tripathi, R., Rath, G., Ralhan, R., Salhan, S. Soluble and membranous vascular endothelial growth factor receptor-2 in pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Yonsei Med J*. 2009; 50 (5): 656-666.

Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, *et al.* Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med* 2006;12:642-9.

Voelkel, N. F., Vandivier, R. W. y Tudor, R. M. Vascular endothelial growth factor in the lung. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* 2006; 290: L209-L221.

Vuorela P, Helske S, Hornig C, Alitalo K, Weich H, Halmesmaki E. Amniotic fluid-soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2000. 95(3):353-357.

Wada H, Satoh N; Kitaoka S; Ono K; Morimoto T; Kawamura T; Nakano T; Fujita T; Shimatsu A; Hasegawa K. Soluble VEGF receptor-2 is increased in sera of subjects with metabolic syndrome in association with insulin resistance. *Atherosclerosis. ScienceDirect.* 2009; 261: 381-388.

Wagner, E. J., and Garcia-Blanco, M. A. Polypyrimidine tract binding protein antagonizes exon definition. *Mol Cell Biol.* 2001; 261: 3281-3288.

Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 1994; 269(43):26988-26995.

Watakabe, A., Tanaka, K., and Shimura, Y. The role of exon sequences in splice site selection. *Genes Dev.* 1993;7: 407-418.

Webb R, Campbell BK, Garverick HA, Gong JG, Gutierrez CG, Armstrong DG. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. *Reproduction in Domestic Ruminants IV. J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1999; 54:33-48.

Webb R, Garnsworthy PC, Gong JG, Armstrong DG. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. *J. Anim. Sci.* 2004;82(E. Suppl.):E63-E74.

Widmer M, Villar J, Benigni A *et al.* Mapping the theories of preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2007;109:168-80.

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.

Wu HM, Yuan Y, Zawieja DC, Tinsley J, Granger H. Role of phospholipase C, protein kinase C, and calcium in VEGF-induced venular hyperpermeability. *Am J Physiol* 1999;276:H535–H542.

Wu LW, Mayo LD, Dunbar JD *et al.* Utilization of distinct signaling pathways by receptors for vascular endothelial growth factor and other mitogens in the induction of endothelial cell proliferation. *J Biol Chem* 2000;275:5096–5103.

Wu, J., and Manley, J. L. Mammalian pre-mRNA branch site selection by U2 snRNP involves base pairing. *Genes Dev.* 1989; 3: 1553-1561.

Wulff C, Wiegand SJ, Saunders PTK, Scobie GA y Fraser HM. Angiogenesis during follicular development in the primate and its inhibition by treatment with truncated Flt-1-Fc (Vascular Endothelial Growth Factor TrapA40). *Endocrinology.* 2001; 42: 3244-3254.

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.

Xu, Fuhua, Hazzard, Timothy, Evans, Amanda, ChRNAock-Jones, Stephen, Smith, Stephen, Stouffer, Richard. Intraovarian actions of anti-angiogenic agents disrupt periovulatory events during the menstrual cycle in monkeys. *Contraception.* 2005; 71: 239–248.

Yamazaki Y, Takani K, Atoda H, Morita T. Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGFs) exhibit potent activity through their specific recognition of KDR (VEGF receptor 2). *J Biol Chem* 2003. 278(52):51985-51988.

Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J: Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000, 407: 242-248.

Yang S, Toy K, Ingle G, Zlot C, Williams PM, Fuh G, Li B, de Vos A, Gerritsen ME. Vascular endothelial growth factor-induced genes in human umbilical vein endothelial cells: relative roles ofKDRand Flt-1 receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22: 1797–1803.

Ye C, Feng C, Wang S, Wang K Z, Huang N, Liu X, Lin Y, and Li M. sFlt-1 gene therapy of follicular thyroid carcinoma. *Endocrinology.* 2004; 145: 817-822.

Yin-Shang NG, Krilleke D, Shima DT. VEGF function in vascular patogenesis. *Experimental Cell Research.* 2005;312: 527-537.

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.

Zachary I. Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001. 280(6):C1375- C1386.

Zeleznik AJ, Schuler HM & Reichert LE, Jr. Gonadotropin-binding sites in the rhesus monkey ovary: role of the vasculature in the selective distribution of human chorionic gonadotropin to the preovulatory follicle. *Endocrinology*. 1981;109: 356-362.

Zhang L, Scott PA, Turley H. Validation of anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF) antibodies for immunohistochemical localization of VEGF in tissue sections: expression of VEGF in the human endometrium. *J Pathol*. 1998; 185:402-8.

Zhao J, Hyman L, and Moore C. Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1999; 63: 405-445.

Zheng, Z. M. Regulation of alternative RNA splicing by exon definition and exon sequences in viral and mammalian gene expression. *J Biomed Sci*. 2004;11: 278-294.

Zeng H, Dvorak HF, Mukhopadhyay D. Vascular permeability factor(VPF)/vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-1 down-modulates VPF/VEGF receptor-2-mediated endothelial cell proliferation, but not migration, through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways. *J Biol Chem*. 2001; 276: 26969–26979.

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

Zimmermann CR, Hartman T, Kavic S, Pauli AS, Bohlen BP, Sauer VM, Kitaewski J. Vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis is essential for gonadotropin-dependent follicle development. *The J. Clin. Invest*. 2003;12:659-669.

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.