

## I. INTRODUCCION

Se conoce como desarrollo folicular al proceso mediante el cual hay un crecimiento continuo y regresión de los folículos que pueblan los ovarios de los mamíferos (*Lucy et al., 1992*). Este proceso permite a algunos folículos crecer y alcanzar la ovulación, mientras que otros en diferentes estadios de desarrollo se perderán por atresia (*Adams, 1999*). Durante el ciclo estral en la mayoría de las especies domésticas (por ejemplo: vaca, ovejas, cabra y caballo), el desarrollo folicular ocurre en forma de olas (*Evans et al., 1994*). En la vaca generalmente se presentan dos o tres olas de crecimiento, aunque también se han observado ciclos con una y cuatro olas (*De Rensis y Peters, 1999*). Cada ola de crecimiento consta de tres fases conocidas como reclutamiento, selección y dominancia. Durante la primera ola folicular, alrededor del día 4 del ciclo, se establece la dominancia (*Rivera y Fortune, 2003*), y según las evidencias, en el día 7 del ciclo, el folículo dominante comienza a perder su capacidad para producir estradiol, con lo cual pierde la dominancia (*Fortune et al., 2001*). Los folículos ejercen la dominancia durante 36-48 horas aproximadamente y al

haber una disminución de E2 (estradiol) e inhibina se da inicio a la atresia (*Bao y Gaverick, 1998; Adams, 1999; Fortune et al., 2001; Valdez et al., 2005*).

Los folículos, durante su crecimiento y desarrollo, reciben señales extraováricas como el de la hormona folículo estimulante (FSH), la hormona luteinizante (LH) y factores de crecimiento, aunque también participan en este proceso factores intraováricos como las hormonas esteroides, factores de crecimiento y algunas hormonas proteicas (*Webb et al., 1999*). La emergencia de cada oleada folicular está caracterizada por el crecimiento de un grupo de folículos o cohorte. Durante los primeros dos días de la emergencia de la ola, la tasa de crecimiento es similar entre los folículos de la misma cohorte, después uno de los folículos es seleccionado para continuar su crecimiento (folículo dominante) mientras los otros sufren atresia (folículos subordinados) (*Adams, 1999*).

El Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) es uno de los factores angiogénicos más importantes y juega un papel decisivo en la elección del folículo

dominante o sano de cada ola de crecimiento folicular (*Yin-Shang et al., 2005*). En los folículos este factor es producido en células de teca y granulosa, aunque existen controversias acerca de los compartimientos donde se encuentra la proteína de VEGF, algunos autores como *Redmer et al., 2001* mencionan que dicha proteína no se encuentra en células de la granulosa de ovinos y *Grazul-Bilska et al., 2007* expone que la proteína del ligando no está presente en células de la granulosa de bovinos, a diferencia de esto, *Greenaway et al., 2004* reporta que la proteína de VEGF se expresa en células de la granulosa de folículos de bovinos. VEGF actúa principalmente a través de dos receptores tipo tirosina cinasa: Flt-1 (fms-like-tirosina-cinasa) y Flk-1 (cinasa fetal hepática-1), la proteína de Flt-1 ha sido localizada en células de la teca y granulosa de humano, cerdas, bovinos (*Otani et al., 2009; Antczak y Van Blerkorn, 2000; Shimizu et al., 2003; Berisha et al., 2002*) y la proteína de Flk-1 se ha encontrado en células de teca y granulosa de cerdas y bovinos (*Shimizu et al., 2003; Berisha et al., 2002*). En algunos sistemas celulares, se han detectado formas solubles de estos receptores, que se conocen como sFlt-1 y sFlk-1, los cuales son el resultado del corte y empalme alternativo

ocurrido en los respectivos preARNm, con lo cual pierden los dominios transmembranales e intracelulares. 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 cual se considera que tienen actividad antiangiogénica (*Kaczmarek et al., 2005*). A excepción de la cerda, en la que se ha encontrado el ARNm de sFlt-1 en cuerpo lúteo, en otros animales de granja se desconoce si existen estas formas truncadas solubles de Flt-1 y Flk-1 en folículos ováricos y en que compartimento folicular se producen (*Kaczmarek et al., 2009*), por lo cual en este trabajo nos propusimos evaluar la expresión del factor VEGF y de sus receptores Flt-1, Flk-1, sFlt-1 y sFlk-1 en diferentes compartimentos (células de la teca, células de la granulosa y líquido folicular) de folículos dominantes de los días 4, 6 y 9 del ciclo estral de la vaca.

## II. MARCO TEÓRICO

### 1. Desarrollo Folicular

El desarrollo folicular es el proceso de crecimiento continuo y regresión de los folículos ováricos (*Lucy et al., 1992*). Este proceso permite a algunos folículos crecer y llegar a la ovulación mientras que otros detendrán su desarrollo y se volverán atrésicos (*Adams, 1999*). Durante este proceso ocurre la foliculogénesis que es definida como la formación de un folículo de De Graff (maduro y preovulatorio) de un grupo de folículos primordiales (sin desarrollo).

Los folículos pequeños o preantrales de bovino se clasifican como: tipo 1 ó folículo primordial (1 capa de células pregranulosas), tipo 1a ó folículo transitorio (1 capa de células de granulosa), tipo 2 ó folículos primarios (1 o 2 capas de células de granulosa), tipo 3 o folículos preantrales pequeños (2-4 capas de células de la granulosa), tipo 4 ó folículos preantrales grandes (4-6 capas de células de la granulosa, y tipo 5 ó folículos antrales pequeños (más de 5 capas de células de la granulosa) (*McNatty et al., 1999*).

En los bovinos, el desarrollo folicular después de la pubertad ocurre en forma de olas, donde de forma sincrónica un grupo de folículos con un tamaño similar son seleccionados para dar lugar al folículo dominante (*Ginther et al., 1989; Rathbone et al., 2001*). En el 95% de los ciclos estrales de las vacas ocurren dos o tres olas de crecimiento folicular, que inician aproximadamente los días 1, 9 y 16 del ciclo estral (*Adams, 1999; Webb et al., 1999*). Cada ola de crecimiento folicular tiene una duración de 7 a 9 días (*Mihm et al., 2000*). La emergencia de cada ola folicular está precedida por un pico transitorio de FSH.

Cada ola de crecimiento folicular consta de tres procesos fundamentales:

### **1.1 Reclutamiento**

Hay dos tipos de reclutamiento durante el desarrollo folicular en los bovinos, inicial y cíclico. En el primero, un grupo de folículos comienzan su desarrollo sin depender del estímulo de gonadotropinas, y en el segundo, un grupo de folículos desarrollan la habilidad para responder a gonadotropinas. En el reclutamiento

inicial un grupo de folículos primordiales inician su crecimiento en respuesta a factores intraováricos como son los miembros de TGF- $\beta$ , por estos factores los folículos alcanzan el estado preantral donde permanecen quiescentes hasta ser susceptibles al estímulo de gonadotropinas FSH (*McGee y Hsueh, 2000*). Después de que se forman los folículos, algunos empiezan a crecer, y a esto se le llama activación folicular (*Fortune et al., 2001*). El reclutamiento cíclico se inicia después de la pubertad, éste resulta del incremento en los niveles de FSH en la circulación durante cada ciclo ovárico, en el que se rescata un grupo de folículos antrales de la atresia (*McGee y Hsueh, 2000*).

En el reclutamiento cíclico sobrevive solamente un número limitado de folículos, mientras que los otros se vuelven atrésicos.

## **1.2 Selección**

La selección folicular es el proceso donde uno o más de los folículos reclutados son elegidos para continuar su crecimiento (*Webb et al., 1999*).

De los folículos que iniciaron su crecimiento en respuesta a FSH durante el reclutamiento cíclico, uno o varios (dependiendo de la especie) son seleccionados para continuar su crecimiento. Entre 6 y 7 folículos que inician su crecimiento, tienen un diámetro de 5 mm y un antro más definido con relación a los otros reclutados, son los que alcanzan este estado de desarrollo (*Fortune et al., 2001*). Se ha sugerido que la producción de estradiol (E2) y la capacidad de responder a las gonadotropinas son características importantes que debe poseer el folículo seleccionado para ser el dominante (*Fortune et al., 2001*).

### **1.3 Dominancia**

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, responde a niveles bajos de FSH y tiene receptores a 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 E2 e inhibina, lo cual ocasiona una disminución en la concentración circulante de FSH (*Kulick et al., 1999*).

Solo se producirá el surgimiento de la siguiente ola cuando pierda la dominancia el folículo de la ola anterior; el tiempo promedio de duración de cada ola folicular es de 7 a 9 días. Durante la primera ola de crecimiento folicular, la dominancia se establece alrededor del día 4 de iniciada, aproximadamente el día 5 o 6 del ciclo (*Rivera y Fortune, 2003*). Existen evidencias que demuestran que para el día 7 del ciclo el folículo dominante pierde capacidad para producir estradiol, lo cual quiere decir que está perdiendo su dominancia (*Fortune et al., 2001*). Algunos autores citan que los folículos ejercen la dominancia de 36 a 48 horas, y después declina su producción de estradiol e inhibina y se vuelven atrésicos también (*Bao y Gaverick, 1998; Adams, 1999; Fortune et al., 2001; Valdez et al., 2005*).

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 los factores mencionados, determina el destino hacia la ovulación o la atresia folicular.

#### **1.4 Atresia**

La atresia folicular constituye la degeneración que sufren la gran mayoría de los folículos que están en los ovarios de los vertebrados y mamíferos (*Rosales 1998*). La atresia es el mecanismo por el cual el ovario pierde, sin llegar a la ovulación, la mayoría de los ovocitos que constituyen el potencial reproductivo. En la mayoría de las especies domésticas se calcula que más del 99 % de los folículos con los que nace una hembra son eliminados por este mecanismo (*Hsueh et al., 1994*). En bovinos se estima que menos del 0.1% de los folículos que pueblan el ovario serán ovulados (*Cushman et al., 2001*).

La atresia folicular se presenta en todos los estadios de desarrollo del folículo. Si bien, durante el desarrollo prepuberal la población de folículos primordiales son

sensibles a presentar atresia (*Sharma, 2000*), conforme se acerca la pubertad y la presencia de folículos antrales se incrementa, éstos se vuelven más susceptibles dada su elevada tasa metabólica (*Sharma, 2000; Quirk et al., 2004*). Durante el desarrollo folicular, los folículos subordinados de cada ola de crecimiento se vuelven atrésicos, al igual que los folículos dominantes que se desarrollan en un medio dominado por progesterona (*Webb et al., 1999; Webb et al., 2004*).

Una gran variedad de cambios morfológicos e histoquímicas pueden ser observados en los diferentes componentes celulares y no celulares de los folículos atrésicos. Estos cambios son altamente variables y no ocurren en una secuencia específica (*Sharma, 2000*). El conjunto de alteraciones varían entre folículos en los diferentes estados de desarrollo y etapas de atresia (*Sharma, 2000*). Basándose en estos cambios histomorfológicos y en la desaparición de la granulosa en los folículos antrales, el estado funcional del folículo ovárico de bovinos ha sido clasificado en tres grados (*Hsueh et al., 1994*):

**Folículo sano:** Caracterizado por un número pequeño

de CG con núcleos picnóticos (<10%) usualmente hacia el antro folicular, mientras que otras todavía están en mitosis (*Hsueh et al., 1994*).

**Atresia inicial:** Se observa un gran número de CG con núcleos picnóticos (entre 10 y 30 %), se reduce la mitosis de CG y éstas ya se pueden observar flotando en el fluido folicular. La capa basal pierde su integridad y hay infiltración de leucocitos hacia la granulosa. El ovocito puede observarse como si hubiera reiniciado la meiosis (*Hsueh et al., 1994*).

**Atresia avanzada:** Se caracteriza por una reducción en el número de CG, las que quedan ya no presentan mitosis y el folículo se colapsa. En otras especies, como la rata, la teca se hipertrofia y en conejas y ovejas se estima que los folículos atrésicos desaparecen aproximadamente a los 7 días de iniciado el proceso. En ratones los folículos antrales tardan 4 días en alcanzar este grado de atresia (*Hsueh et al., 1994*). En los folículos antrales de bovino la característica más importante de la atresia es la muerte celular de las CG.

La salud o la atresia de los folículos dependen del

tamaño de estos. La salud folicular está relacionada con el diámetro de los folículos preantrales y antrales durante las etapas de reclutamiento, selección y dominancia.

Durante cada ola del crecimiento sólo 1 a 6 folículos (4-5 mm de diámetro) son los que comienzan su crecimiento en respuesta al pico transitorio de FSH (*Hamilton et al 1995*). Para que los folículos sean reclutados deben tener ciertas características, los que reinician su crecimiento durante el reclutamiento cíclico son folículos antrales tempranos (*Webb et al., 2003*). Como se mencionó anteriormente, las olas de crecimiento están precedidas por un pico preovulatorio de FSH, y si éste es bloqueado hay un retraso de la ola de crecimiento (*Quirk et al., 2004*). FSH y LH son factores de proliferación y sobrevivencia celular que favorecen el crecimiento de los folículos en desarrollo (*McGee y Hsueh, 2000*).

## **2. Hormonas y Factores de crecimiento en el desarrollo folicular**

### **2.1 Hormonas**

Las hormonas FSH, LH y E2 son los factores de sobrevivencia más importantes en los folículos antrales. Se ha demostrado que el nivel de estrógenos en los folículos del ganado bovino es un indicador del estado de salud (*Rosales y Guzmán, 2008*).

La alta concentración de estradiol en folículos dominantes se relaciona con la mayor expresión de ARNm para aromatasa, para el receptor  $\beta$  de estrógenos y para receptores de FSH y LH en células de la granulosa en comparación con los subordinados. La alta concentración de E2 en folículos dominantes sanos ha sido asociada con la expresión de genes relacionados con la sobrevivencia celular, mientras que en los folículos que no tienen grandes cantidades de estrógeno hay una expresión de genes asociados a la apoptosis (*Rosales y Guzmán, 2008*).

### 2.1.1 Gonadotropinas

En las vacas, cada oleada de crecimiento folicular tiene una duración de 7 a 9 días (*Mihm et al., 2000*). Los primeros tres días de la oleada se caracterizan por un pico transitorio de FSH, una fase de selección que resulta en la reducción del número de folículos y la declinación de la concentración de FSH circulante, que coinciden con el inicio de la atresia de la mayoría de los folículos restantes, sin embargo, aquel folículo con un diámetro mayor de 8 mm puede permanecer como folículo dominante (*Mihm et al., 2000*) y ovulará si coincide con la regresión del cuerpo lúteo.

La regulación de los receptores a GnRH (Hormona liberadora de gonadotropina) está dada por la propia hormona y por el E2. La GnRH es capaz de iniciar la síntesis y secreción de LH y FSH a través de la unión con su receptor en los gonadotrofos, y la cantidad de LH liberada por estas células en respuesta a GnRH dependerá de la concentración de sus receptores. Estos resultados sugieren que el estradiol más que inhibir directamente la síntesis o liberación de FSH cambia el patrón de secreción de GnRH y la sensibilidad de la

hipófisis a esta hormona (*Turzillo et al., 1998; Looper et al., 2003*).

Aunque el folículo dominante puede continuar su crecimiento en un medio con concentraciones bajas de FSH, la captación de LH se hace indispensable para continuar su crecimiento (*Webb et al., 2004*). Esta idea se sustenta por evidencias que muestran la aparición de ARNm para el receptor a LH en células de granulosa de folículos dominantes de 8 y 9 mm de diámetro (*Webb et al., 1999*), por lo que se ha sugerido que un patrón característico de pulsos de LH, adicionado a la presencia de receptores, es requerido para mantener la capacidad ovulatoria de los folículos de más de 9 mm (*Webb et al., 2004*).

### *2.1.2 Capacidad Esteroidogénica*

La secreción de estradiol es fundamental para que un folículo ovule. Además de desencadenar el aumento de gonadotropinas en el ciclo preovulatorio, el estradiol es un factor de crecimiento intraovárico, de diferenciación y de sobrevivencia. Esta hormona estimula la proliferación de las células de la granulosa y las protege contra la



apoptosis. Los folículos que son seleccionados deben ser capaces de producir una gran cantidad de E2, ya que esta hormona será la encargada de desencadenar el pico preovulatorio de LH que induce la ovulación en donde él o los ovocitos maduros son liberados hacia el oviducto para ser fertilizados (*Quirk et al., 2004*).

En relación a la diferencia esteroideogénica entre folículos seleccionados y aquellos que sólo son reclutados, *Webb et al. (1999)* reportan que la expresión del ARNm del complejo P450 ssc es mayor en las células de folículos seleccionados que en folículos que sólo son reclutados, al igual que la expresión del complejo P450c17 y 3B-HSD, en las células de la teca de folículos seleccionados y del complejo P450arom en células de la granulosa. Esta expresión diferencial de los complejos enzimáticos entre los compartimentos foliculares es importante, ya que como se mencionó anteriormente, las células de la teca sólo son capaces de convertir colesterol a progesterona y ésta a andrógenos, pero no pueden convertir andrógenos a estrógenos, debido a que no expresan el complejo enzimático P450arom, por su parte las células de la granulosa aunque pueden convertir el colesterol a

progesterona, no pueden producir andrógenos (por no expresar el complejo P450c17), en cambio, son capaces de aromatizar los andrógenos provenientes de las células de la teca para convertirlos a estrógenos (*Fortune et al., 2001; Rathbone et al., 2001*).

La importancia de la producción de E2 por el folículo que es seleccionado también se ve reflejada por la concentración de esta hormona en el líquido folicular. *Valdez et al. (2005)* reportan que en los folículos dominantes las concentraciones de E2 en líquido folicular decrece del día 4 al 6 y 8 de iniciada la primera ola de crecimiento folicular. Este fenómeno está relacionado con el inicio de la atresia del folículo dominante.

Aunque la capacidad de respuesta a las gonadotropinas y la capacidad de producir E2 son factores importantes en la selección del folículo dominante, existen otros factores moleculares que regulan este proceso y que se mencionan a continuación.

## **2.2 Factores de Crecimiento (Citocinas)**

Son hormonas polipeptídicas con una o más cadenas, que son diferentes a las hormonas proteicas porque: se producen en diversas células, incluyendo el sistema inmune, actúan en gran cantidad de órganos y tejidos incrementando y reduciendo el efecto de otras hormonas, actúan mediante mecanismos autócrinos, parácrinos y yuxtácrinos y esporádicamente de manera endocrina (*Arai et al., 1990*).

Las citocinas que forman parte de los factores de sobrevivencia de los folículos son:

### *2.2.1 Factor de Crecimiento Insulinoide I y II (IGF I-IGF II)*

Entre los factores de crecimiento que sobresalen por su importancia en el desarrollo y la atresia folicular es el sistema del factor de crecimiento similar a la insulina o insulinoide IGF. El sistema IGF es bien conocido por sus efectos sobre la diferenciación y proliferación de células tanto normales como malignas. Los componentes del sistema comprenden a los IGFs (IGF-I

e IGF-II), dos receptores (IGFR-I e IGF-II), proteínas ligadoras de IGF (IGFBPs) y proteasas de IGFBP. El IGF incrementa la secreción de estradiol y la respuesta celular de las gonadotropinas en células de la granulosa en bovinos (*Fortune et al., 2001*).

Los ligandos IGF regulan el crecimiento y la diferenciación de células de teca y de la granulosa, además se dice que pueden ser factores antiapoptóticas (*Fortune et al., 2001*).

El IGF tiene unas proteínas de unión (IGFBPs) que se encargan de regular la bioactividad del IGF I y II. Durante el desarrollo folicular, se ha sugerido que la disminución de los niveles de IGFBPs y el aumento en la proteólisis de estas proteínas es una característica definitiva para la selección del folículo ovulatorio (*Fortune et al., 2001*).

IGFBP-3 es la proteína ligadora más abundante en la sangre y en líquido folicular, pero en la mayoría de especies examinadas ésta se expresa poco o no se expresa en todos los tejidos del ovario. IGFBP-2, -4, y -5 también han sido detectadas en líquido folicular de

bovinos. El ARNm de IGFBP-2 y 4 se ha localizado en células de la granulosa y teca respectivamente (*Fortune et al., 2004*).

### 2.2.2 Factor de Crecimiento Transformante alfa y beta (TGF $\alpha$ y $\beta$ )

El factor TGF- $\alpha$  es una proteína cuya estructura es muy parecida a la del Factor de Crecimiento Epidermal (EGF), se une al receptor EGF y tiene una actividad semejante. Este factor juega un papel importante en la estimulación y el mantenimiento del crecimiento de las células del folículo primordial, esta actividad se conserva hasta el estadio preovulatorio. TGF- $\alpha$  puede funcionar como iniciador del crecimiento y actuar de manera sinérgica con los IGFs para mantener el crecimiento óptimo de las células foliculares. TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$  son producidos por las células de la teca y tienen un papel autócrino al influir en estas células y parácrino cuando regulan el crecimiento de las células de la granulosa (*Hernández et al., 1990*).

TGF- $\beta$  inhibe el crecimiento celular y coloca a la célula dentro de un estado de diferenciación no proliferativo, lo

que sugiere la participación de los factores en la inhibición de crecimiento de las células de la granulosa en folículos atrésicos y en la prevención del crecimiento prematuro de los folículos primordiales (*Hernández et al., 1990; revisado por Rosales, 1998*).

### *2.2.3 Factor de Crecimiento Epidermal (EGF)*

El Factor de Crecimiento Epidermal es uno de los primeros factores de crecimiento que se identificaron en mamíferos. Este factor es sintetizado como precursor inactivo y es procesado por una proteasa. EGF juega un papel importante en el ovario, se expresa durante el desarrollo del ovocito, estimula la replicación de células de la granulosa lo que indica que participa en el desarrollo folicular (*Conti et al., 2006*).

En algunos estudios realizados se dice que EGF está implícito en el crecimiento folicular y maduración de células de la granulosa. Este factor promueve un efecto negativo sobre la regulación de FSH en la esteroidogénesis y diferenciación de células de la granulosa en folículos preantrales. El pico de LH produce cambios profundos en todas la células

foliculares que se requieren para la ovulación y desarrollo del cuerpo lúteo. Los cambios incluyen reprogramación de Células de granulosa que se convierten en células lúteas, reingreso del ovocito al ciclo celular y secreción de células de cumulus (*Revisado por Conti et al., 2006*).

#### *2.2.4 Factor de Crecimiento Nervioso (NFG)*

Las Neurotrofinas (NTS) desempeñan un papel esencial en la diferenciación y la supervivencia de poblaciones neuronales del sistema nervioso central y periférico. Se dice que también contribuyen con la regulación del desarrollo de células no neuronales, incluyendo las del subconjunto de sistema inmune, cardiovascular y endocrino. NGF, a través de sus receptores trkA y p75, precede la formación de folículos primordiales y primarios. También se dice que este factor ejerce acciones esenciales en el desarrollo de folículos ováricos, aunque no se conoce exactamente como lo hace (*Dissen et al., 2000*).

### 3. Irrigación folicular (Angiogénesis)

Los folículos preantrales pequeños no tienen un suministro vascular propio (*Wulff et al., 2001*). La irrigación folicular comienza con la formación de dos redes concéntricas de vasos sanguíneos que se dirigen hacia la teca interna y teca externa, estas redes capilares, en un folículo íntegro, no penetran la granulosa (*Goede et al., 1998; Tempel- Brami y Neeman, 2002; Wulff et al., 2002*). El establecimiento del plexo capilar de la teca interna coincide con el período de rápido crecimiento y diferenciación de los folículos, por lo cual se ha propuesto que el establecimiento del folículo dominante puede depender de la formación de vasos y del aporte sanguíneo, así como del incremento en la permeabilidad vascular (*Reynolds y Redmer, 1998; Geva y Jaffe, 2000*).

El desarrollo folicular y la formación y mantenimiento del cuerpo lúteo son procesos que dependen de la generación de vasos sanguíneos (angiogénesis) (*Gutman et al., 2006*). En los ovarios, cada fase específica del ciclo hormonal es acompañada por cambios vasculares radicales (*Shimizu et al., 2003*). La



angiogénesis es iniciada durante el desarrollo folicular (*Ferrara et al., 1992*) y continúa a lo largo de éste (*Wulff et al., 2001; Greenaway et al., 2004*). Durante el proceso de la angiogénesis intervienen factores de crecimiento, entre los que destacan: el factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF), Factor de crecimiento de Fibroblasto (FGF), y la Angiopoyetina (ANP1, 2) (*Kaczmareck et al., 2005*).

La angiogénesis es esencial tanto en la fase folicular como de la fase lútea del ciclo ovárico. 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*). Asociado con la angiogénesis del ovario, útero y placenta, las células endoteliales exhiben una tasa mitogénica extremadamente alta. De esta forma, cuando estos tejidos maduran son altamente vascularizados y reciben un mayor flujo sanguíneo en relación a su peso específico comparado con otros tejidos corporales. El incremento en la vascularización y el flujo sanguíneo de estos tejidos es un reflejo de sus altas demandas metabólicas. La vascularización del folículo durante la fase folicular también está asociada al

incremento de su tamaño durante la selección y dominancia folicular (*Reynolds y Redmer, 1998; Barboni et al., 2000*).

### **3.1 Factor de Crecimiento Endotelio Vascular (VEGF)**

La familia de VEGF está compuesta por varios miembros: VEGF-A, PlGF (Factor de crecimiento placentario), 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*).

#### *3.1.1 Características de VEGF y su participación en la Angiogénesis*

El VEGF es uno de los primeros factores angiogénicos identificados, y se cree que es el regulador más importante de la angiogénesis normal y patológica (*Yin-Shang et al., 2005*).

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 incremento vascular resulta de la participación de gonadotropinas y mejora el flujo sanguíneo en folículos preovulatorios (Wulff et al., 2001; Zimmerman et al., 2001). La vascularización del folículo es necesaria para que éste reciba hormonas o sus precursores, factores de crecimiento, oxígeno y nutrientes. Esto sugiere que la entrada de gonadotropinas periféricas a través de un sistema vascular altamente desarrollado en el folículo juega un papel importante en la selección y crecimiento del folículo dominante (Wulff et al., 2002).

Durante la angiogénesis se forman nuevos vasos sanguíneos de los preexistentes en respuesta a la producción de factores angiogénicos e inhibidores (Gutman et al., 2006). La regulación del desarrollo de los vasos sanguíneos es un evento crucial en la maduración y regresión folicular. Se sabe que el desarrollo folicular depende del suministro de sangre cada vez mayor al contrario de lo que pasa durante la atresia donde se dice que hay una reducción del flujo sanguíneo. En investigaciones llevadas a cabo en roedores y primates se señala a VEGF como un factor clave para regular la vascularización del ovario. En

estudios *in vivo* e *in vitro* sugieren que la producción de VEGF se encuentra influenciada por gonadotropinas (*Barboni et al., 2000*).

En trabajos con cerdas primerizas ovariectomizadas en diferentes tiempos post aplicación de gonadotropina coriónica equina (eCG) (1250 UI) se encontraron incrementos en los niveles de VEGF en el líquido folicular a las 30 y 60 hrs post tratamiento. Estos niveles se incrementaron mayormente en los folículos grandes (> 5 mm) (*Barboni et al., 2000*). Resultados similares fueron observados en los niveles de ARNm de VEGF en células de la granulosa, sin embargo no se observaron cambios importantes en la teca (*Barboni et al., 2000*). *Mattioli et al. (2001)* mencionan que los folículos antrales de cerdas, producen cantidades elevadas de VEGF durante su fase de crecimiento en respuesta a las gonadotropinas, de la misma manera explican que un apropiado suministro de sangre probablemente represente un mejor regulador que condicione la función de las células del folículo así como el crecimiento y maduración del ovocito. En este contexto, la habilidad del folículo para producir VEGF puede representar un

proceso esencial o un paso limitante para el crecimiento del folículo, por lo tanto podría ser una característica distintiva del folículo que es seleccionado. En este mismo trabajo se muestra como los folículos atrésicos tienen una menor distribución vascular en comparación con los folículos sanos. También, la producción de VEGF es regulada por el tamaño y estado funcional del folículo, los folículos pequeños acumulan muy poca cantidad del VEGF en el líquido folicular, mientras que los grandes iniciaron una producción copiosa en respuesta a la estimulación con gonadotropinas (*Mattioli et al., 2001*). Otros autores reportan que el tratamiento con eCG en cerdas incrementó el número de capilares de los folículos, de la misma forma reportan que la densidad de los capilares se incrementó notablemente conforme aumentaba el diámetro del folículo.

### 3.1.2 Isoformas de VEGF

En mamíferos se han identificado 12 isoformas de VEGF resultado del proceso de corte y empalme alternativo del preARNm de un solo gen de VEGF que contiene 8 exones (*Jia et al., 2001; Nowak et al., 2008*).

Las isoformas se clasifican como proangiogénicas cuando el sitio de selección del corte y empalme en el exón 8 ocurre en su porción proximal (8a), estas isoformas son conocidas como VEGF<sub>xxx</sub>, siendo xxx el número de aminoácidos, e isoformas antiangiogénicas cuando el sitio de selección para el corte y empalme en el exón 8 ocurre en la parte distal (8b), (VEGF<sub>xxx</sub>b). El exón 8a codifica los aminoácidos Cis-Asp-Lis-Pro-Arg-Arg, mientras que el exón 8b codifica Ser-Leu-Tri-Arg-Lis-Asp (*Nowak et al., 2008*).

Las isoformas proangiogénicas son: VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>148</sub>, VEGF<sub>168</sub>, VEGF<sub>183</sub>, VEGF<sub>189</sub> y VEGF<sub>206</sub>. Las isoformas VEGF<sub>121</sub> y VEGF<sub>165</sub> son más ácidas y no se unen fácilmente a la heparina, y por lo tanto se difunden más fácilmente entre las células endoteliales. Por el contrario, las isoformas VEGF<sub>189</sub> y VEGF<sub>206</sub> son básicas y se unen a la heparina con mayor facilidad permaneciendo completamente en la matriz extracelular (*Ferrara y Davis-Smyth, 1997*). La actividad biológica de VEGF<sub>145</sub> no ha sido bien establecida (*Cheung et al 1995*). VEGF<sub>121b</sub>, VEGF<sub>165b</sub>, VEGF<sub>145b</sub>, VEGF<sub>189b</sub> y VEGF<sub>183b</sub> son las isoformas antiangiogénicas que resultan del corte y empalme distal dentro del sitio de

empalme aceptor del exón 8b cuyo marco de lectura abierto es de 18 bases. De las isoformas antiangiogénicas la más estudiada es la VEGF<sub>165b</sub>, ésta inhibe a VEGF<sub>165</sub>, la cual induce proliferación endotelial, vasodilatación y angiogénesis experimental y fisiológica (Nowak et al., 2008).

### **3.2 Receptores de VEGF**

#### **3.2.1 Receptores Tirosina Cinasa**

Dos de los receptores más importantes para VEGF son Flt-1 (fms-like-tirosina-cinasa) y Flk-1 (cinasa fetal hepática-1), también conocidos como VEGF-R1 y VEGF-R2 respectivamente (Shimizu et al., 2007). Estos son receptores transmembranales tipo tirosina cinasa que tienen una alta afinidad por VEGF. Están localizados primordialmente en células del endotelio vascular (Kazmareck et al., 2005), además Flt-1 también se ha localizado en células hematopoyéticas, macrófagos y monocitos (Kendall et al., 1993; Gruemmer et al., 2005), en células de la teca y de la granulosa (Otani et al., 1999), y Flk-1 en células de la

granulosa de folículos (*Greenaway et al., 2004*). VEGF se une al Flt-1 con una constante de disociación (Kd) de 10-20 pM, por esto se considera que este factor tiene una alta afinidad para este receptor (*Vries et al., 1992*) en comparación con el Flk-1, que tiene una menor afinidad uniéndose con una Kd de 75–125 pM (*Ferrara, 2004*). La capacidad de autofosforilación de Flk-1 es al menos 10 veces mayor que la del Flt-1, lo cual nos indica que Flk-1 tiene una mayor capacidad en la transducción de la señal de VEGF que Flt-1 (*Ferrara, 2004*). Algunos autores consideran a Flt-1 como un anzuelo para VEGF, pero con poca capacidad de señalización (*Yang et al., 2002*), mientras que otros le han atribuido función en la proliferación celular, quimiotaxis (*Matsumoto et al., 2002*) y sobrevivencia celular (*LeCouter et al., 2003*). Además, Flt-1, durante el desarrollo embrionario, es capaz de inhibir y secuestrar a VEGF evitando que éste interactúe con Flk-1.

### *3.2.2. Receptores solubles*

Flt-1 es un receptor de membrana que por un proceso de corte y empalme alternativo en el exón 13 de su preARNm da lugar a un receptor soluble (sFlt-1). Los



ARNm de Flt-1 y sFlt-1 surgen del mismo gen Flt-1, que tiene un mismo sitio para comenzar la transcripción, pero el preARNm es procesado de forma diferente en 3', dando lugar a ARNm específicos de Flt-1 y sFlt-1 con diferente tamaño. El transcrito de Flt-1 contiene 30 exones y es traducido a una proteína transmembranal que pesa aproximadamente 200kDa, que contiene un dominio extracelular N-terminal con dominios de unión al ligando, un único segmento que atraviesa la membrana y un dominio intracelular C-terminal que contiene 2 dominios de tirosina-cinasa. El transcrito de sFlt-1 contiene únicamente los primeros 13 exones de Flt-1, y la proteína a la que da lugar conserva los sitios de unión al ligando, pero carece del segmento que atraviesa la membrana y de los 2 dominios tirosina-cinasa intracelulares. Como consecuencia la proteína sFlt-1 se secreta como una proteína de 100 kDa aproximadamente, que se puede unir a VEGF con gran afinidad, funcionando como antagonista del VEGF circulante (*Kendall y Thomas, 1993; Huckle y Roche, 2004, Revisado por Thomas et al., 2007*). Este receptor soluble, al igual que los otros dos receptores Flt-1 y Flk-1 compite por el ligando VEGF, pero aún se sabe poco sobre la regulación natural de sFlt-1 (*Kaczmarek et al.,*

2005; Sela et al., 2008). Estudios recientes han comenzado a establecer las funciones fisiológicas de sFlt-1 en diversos tejidos como la cornea y el útero, demostrándose un papel fisiopatológico de sFlt-1 en el embarazo (Thomas et al., 2007). En el único animal de granja que se ha estudiado el ARNm de sFlt-1 es en cerdas, y se dice que este receptor está implicado en mantener la función del cuerpo lúteo cuando se produce un embarazo en las cerdas (Kaczmarek et al., 2009).

El transcrito del receptor Flk-1, al igual que el del receptor Flt-1, sufre un proceso de corte y empalme diferencial del preARNm, y como resultado de esto se obtiene un transcrito específico de sFlk-1. Este receptor soluble conserva su alta afinidad por VEGF, aunque su unión al factor es más débil que en el caso de sFlt-1. Al igual que la forma soluble de Flt-1, carece de su dominio tirosina cinasa, y no es capaz por tanto de activar una transducción de señal para inducir la proliferación endotelial. sFlk-1 tiene un efecto antiangiogénico y ha sido detectado recientemente en ratones y en seres humanos (Wada et al., 2008).

### **3.3 Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF)**

El factor de crecimiento de fibroblastos, al igual que VEGF, estimula la liberación y la actividad de proteasas, integrinas y colagenasas sobre la membrana extracelular para formar redes microvasculares. El FGF es importante en la regulación de una amplia gama de funciones de los ovarios, entre ellas la mitosis de las células de la granulosa, la esteroidogénesis y la apoptosis (*Skinner, 2005*).

FGF se ha localizado en folículos primordiales y primarios de varias especies. Este factor está localizado en células de la granulosa de folículos preantrales, pero no en células de la granulosa de los folículos primordiales de humanos. En células de teca de los folículos en desarrollo también está presente. Los receptores de este factor se han reportado en células de la granulosa de folículos antrales de vaca y rata (*Skinner, 2005*).

### **3.4 Angiopoyetina (ANTP-1 y ANTP-2)**

Las angiopoyetinas se asocian a los cambios de la red perifolicular cuando hay un incremento de LH. ANTP-1 y ANTP-2 actúan a través de la activación de receptores tirosina-cinasa (Ate1 y 2), tanto los receptores como sus ligandos se expresan en muchos tejidos (*Shimizu et al., 2007*).

ANTP-1 se expresa en las células de la teca de manera uniforme durante el desarrollo folicular (*Fraser, 2006*). ANTP-2 ha sido identificado como el segundo ligando para Tie2, este tiene una afinidad similar al ANTP-1 por el receptor, pero tiene una fosforilación mas débil y se considera como un antagonista endógeno de ANTP-1 (*Shimizu et al., 2007*). El sistema de señalización de Angiopoyetina-Tie es importante para la vascularización en el desarrollo folicular y el cuerpo lúteo (*Shimizu et al., 2007*).

### **4. VEGF y sus receptores en el desarrollo folicular y la atresia**

En algunas estructuras ováricas de diferentes especies

se ha encontrado el ARN mensajero y las proteínas de VEGF, Flt-1 y Flk-1 ( ver Cuadro 1).

**Cuadro1.** Estructuras ováricas de diferentes especies donde se ha reportado la proteína y el ARNm de VEGF, Flt-1 y Flk-1.

Molécula	Proteína/ARNm	Estructura ovárica	Especie	Autor
VEGF	ARNm isoformas 120, 164 y 188	CG	Bovino	<i>Yang y Fortune, 2007</i>
	ARNm y proteína	CG, CT, CL y LF	Bovino	<i>Greenaway et al., 2004; Zimmerman et al., 2003; Grazul-Bilska et al., 2007</i>
	ARNm y proteína	CG y CT	Ovino	<i>Redmer et al., 2001</i>
	ARNm isoformas 120, 164 a-b y 168	CG, CT	Cerda	<i>Barboni et al., 2000; Mattioli et al., 2001., Ribeiro et al., 2007</i>
	Proteína	CG	Ratas y cerda	<i>Danforth et al., 2003; Grasselli et al., 2003</i>
	ARNm y proteína	LF, CT	Cerda	<i>Shimizu et al., 2003</i>
Flt-1	Proteína	CG, CT	Humano	<i>Otani et al., 1999; Antczak y Van Blerkom, 2000</i>
	ARNm	CT	Cerda	<i>Shimizu et al., 2003</i>
	Proteína y ARNm	CL	Cerda	<i>Ribeiro et al., 2007</i>
	ARNm	Complejo del cumulus	Vaca	<i>Einspaner et al., 2002;</i>

		(oocito), CG y teca interna		<i>Berisha et al., 2000</i>
Fik-1	ARNm y proteína	CL	Cerda	<i>Ribeiro et al., 2007</i>
	ARNm y proteína	CG, CT	Cerda	<i>Shimizu et al., 2003</i>
	ARNm	Complejo del cumulus (oocito)	Vaca	<i>Einspaner et al., 2002</i>
	ARNm	CG y teca interna	Vaca	<i>Berisha et al., 2000</i>
	ARNm y proteína	CG	Vaca	<i>Greenaway et al., 2004</i>
CG (células de la granulosa, CT (células de la teca) y LF (líquido folicular)				

Algunos resultados sugieren que la eCG es capaz de estimular la producción del VEGF (*Barboni et al., 2000; Mattioli et al., 2001*), y sabiendo que esta hormona es utilizada comúnmente para las técnicas de hiperovulación, se cree que VEGF incrementa la densidad capilar de los folículos (*Shimizu et al., 2002*), favoreciendo la llegada de nutrientes y gonadotropinas, para que los folículos seleccionados escapen de la atresia (*Barboni et al., 2000*). Esta hipótesis ha sido reforzada por otros trabajos (*Zimmerman et al., 2001; Wulff et al., 2001; Wulff et al., 2002*). La supresión de la angiogénesis en folículos secundarios y terciarios al bloquear los receptores de VEGF con VEGFTrap

(antagonista que se une a los receptores de VEGF) provocaron que la proliferación en las células de la teca se redujera en un 87% en comparación con los controles. Conociendo que sólo el 25-30% de la proliferación celular es de origen endotelial, se sugiere que el tratamiento tiene un efecto secundario, inhibiendo la proliferación de células no endoteliales en la teca.

De la misma forma, la proliferación de la granulosa en folículos secundarios fue reducida después del tratamiento. Este fenómeno puede ser explicado posiblemente porque la disminución en la vascularización de los folículos afecta la disponibilidad de factores de crecimiento, gonadotropinas, nutrientes y oxígeno para el adecuado desarrollo del folículo trabajos (*Zimmerman et al., 2001; Wulff et al., 2001; Wulff et al., 2002*), o bien por la inhibición y protección celular en la granulosa (*Greenaway et al., 2004*). *Shimizu et al. (2002)* mencionan que la red capilar de los folículos dominantes es más extensa y más permeable que la de los folículos subordinados, y por lo tanto los folículos son capaces de adquirir una mayor proporción de gonadotropinas, hormonas y factores de crecimiento.

La relación de la angiogénesis folicular y el inicio de la atresia es controversial, debido a las dificultades de establecer una relación temporal entre los dos fenómenos. Sin embargo estudios con marmosetas en los que se inhibe a VEGF con VEGF Trap R1R2, encontraron que después del tratamiento, el número de folículos atrésicos se incrementó considerablemente en comparación con el grupo control, además reportan que el diámetro de los folículos de los animales control fue mayor que el de los folículos de animales tratados (*Taylor et al., 2007*). Además también una reducción de la vascularización y atresia fue observada por *Wulff et al. (2002)*.

En relación con estos resultados, *Zimmerman et al. (2003)*, observaron que la administración de un anti Flk-1 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/Flk-1 juega un papel crítico en el proceso de desarrollo folicular dependiente de gonadotropinas. Además se ha observado que la inhibición de Flk-1 no afecta la supervivencia de la vasculatura existente en el folículo,



ya que al administrar PMSG (gonadotropina sérica de yegua preñada) en los folículos preantrales pequeños se desarrollaron a folículos antrales tempranos pero no a folículos ovulatorios.

*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 Flk-1/KDR 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 Flk-1 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 Flk-1. La reducción en la muerte celular por VEGF parece estar mediada a través de la reducción en la expresión de la caspasa 3 activa.

*Gruemmer et al. (2005)* encontraron que al incubar células umbilicales (HUVECs) con 30% de líquido folicular humano hay un aumento en la proliferación de sFlt-1 y una inhibición de la producción de VEGF en las células endoteliales. sFlt-1, al actuar como antagonista,

captura VEGF libre y por lo tanto reprime la angiogénesis mediada por este factor de crecimiento. Este receptor soluble puede modular la actividad fisiológica de VEGF, así como la angiogénesis en el tracto reproductivo femenino, este factor es secretado en la placenta y puesto a circular libremente durante el embarazo, se demuestra que el aumento de los niveles de sFlt-1 se relaciona con la preeclampsia (*Gruemmer et al., 2005*).

Acerca de la forma soluble de Flk-1 se sabe muy poco y no hay estudios que lo reporten en líquido folicular. La información que se conoce sobre este receptor soluble es controversial, y solo es claro que juega un papel antiangiogénico. En un estudio reciente se midió la concentración de sFlk-1 en suero y se identificó la proteína en células placentarias para evaluar su participación en la preeclampsia. Se compararon los niveles séricos de sFlk-1 en mujeres gestantes sanas, mujeres no gestantes y mujeres gestantes con preeclampsia, los resultados indican que no hubo diferencias en la concentración plasmática de sFlk-1 entre mujeres no gestantes y gestantes sanas, sin embargo en mujeres con preeclampsia, los niveles

sérlicos de sFlk-1 se vieron significativamente disminuidos comparados con los encontrados en las mujeres con gestación normal, estos cambios también fueron acompañados por una reducción significativa en la inmunoreactividad de Flk-1 en vellosidades trofoblásticas, células endoteliales y células Hofbauer de la placenta de las mujeres con preclampsia con una gestación de más de 34 semanas. Probablemente esta expresión disminuida de Flk-1 en células endoteliales y de Hofbauer en las mujeres con preeclampsia puede alterar las acciones de VEGF necesarias para un buen desarrollo placentario. Por otro lado, la disminución de Flk-1 y sFlk-1 en la preclampsia puede deberse a la poca disponibilidad que existe de VEGF libre en las células endoteliales que se da en esta patología, lo cual no estimula la presencia de este receptor (*Tripathi et al., 2009*).

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En cada ciclo estral de los bovinos, el folículo sano de mayor diámetro, ejerce una dominancia sobre el resto de los folículos de su cohorte, y sólo surgirá la siguiente ola cuando éste pierda la dominancia. Tal como se mencionó anteriormente, durante la primera ola folicular, la dominancia se establece alrededor del día 4 del ciclo (*Rivera y Fortune, 2003*). Existen evidencias que demuestran que para el día 7 del ciclo, el folículo dominante comienza a perder mucha de su capacidad para producir estradiol, lo cual quiere decir que empieza a volverse atrésico (*Fortune et al., 2001*), lo anterior significa que un folículo dominante en el día 6 del ciclo estral se encuentra como dominante sano, y para el día 9 del ciclo será un folículo dominante atrésico. De esta manera, el modelo de crecimiento folicular de las vacas brinda la oportunidad de acceder al estudio de folículos sanos y atrésicos bajo condiciones fisiológicas, lo cual nos permite profundizar en el conocimiento sobre el desarrollo folicular.

El Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular es el regulador más importante de la producción de vasos sanguíneos en el ovario, y a través de los receptores Flk-1 y Flt-1 estimula la angiogénesis en los folículos y el cuerpo lúteo (*Ferrara et al., 1998; Shimizu et al., 2002*). A Flt-1 algunos autores lo consideran como un anzuelo para VEGF pero con poca capacidad de señalización (*Yang et al., 2002*), mientras que otros le han atribuido función en la proliferación celular, quimiotaxis (*Matsumoto et al., 2002*) y sobrevivencia celular (*LeCouter et al., 2003*). La función de Flk-1 en la proliferación, permeabilidad, sobrevivencia y en la angiogénesis en general, es mucho más clara (*Takahashi y Shibuya, 2005*). Estos dos receptores, por corte y empalme alternativo en el preARNm, producen cada uno, una proteína que pierde los dominios intramembrana e intracelular, lo cual los hace solubles (sFlt-1 y sFlk-1). Estas formas solubles de los receptores son considerados con actividad antiangiogénica porque atraen al ligando con la misma intensidad que los receptores completos pero sin señalización. Estos receptores solubles no han sido detectados en ningún tejido de bovino, ni en folículos de especies domésticas. La información que existe con

respecto al sitio de síntesis de la proteína VEGF y sus receptores de membrana y solubles dentro de un folículo en las diferentes especies animales es parcial, limitada y en algunos casos inexistente, desconociéndose también la dinámica de estas proteínas en los distintos momentos por los que pasa un folículo dominante. Por lo anterior fue nuestro interés conocer el compartimento folicular en el que se expresan las proteínas VEGF, Flk-1, Flt-1, sFlt-1 y sFlk-1, así como el efecto que pueda tener el día del ciclo estral de obtención de los folículos sobre el patrón de expresión de estas proteínas.

#### **IV. OBJETIVOS**

##### **Objetivo General:**

Evaluar la expresión del factor VEGF y de sus receptores Flt-1, Flk-1, sFlt-1 y sFlk-1 en células de la teca, células de la granulosa y líquido folicular de folículos dominantes de los días 4, 6 y 9 del ciclo estral.

##### **Objetivos Específicos:**

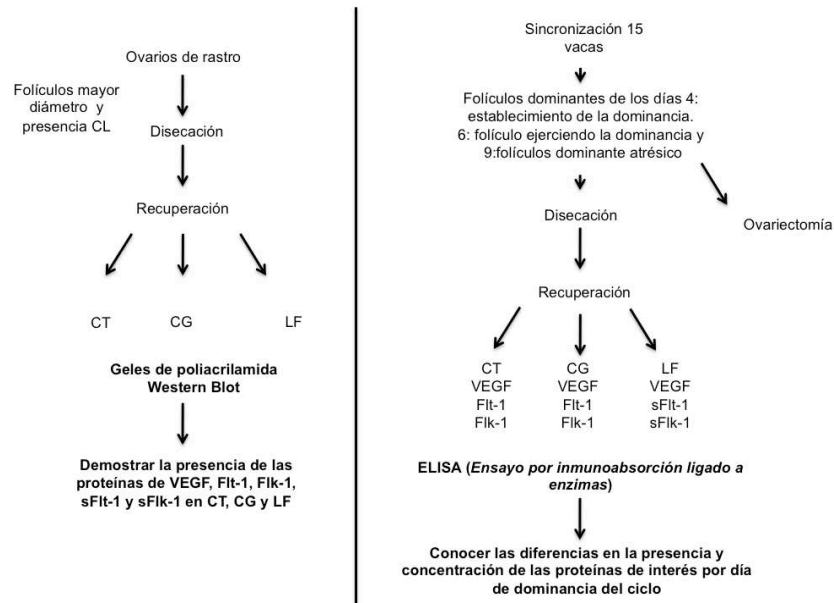
1. Identificar el compartimento folicular donde se encuentran las proteínas VEGF, Flt-1, Flk-1, sFlt-1 y sFlk-1.
2. Conocer cual de los compartimentos foliculares es la mayor fuente de cada una de las proteínas estudiadas.
3. Determinar si la expresión de las proteínas en cuestión en cada compartimento folicular se modifica de acuerdo al día de la dominancia de los folículos.

## **V. HIPÓTESIS**

1. En folículos dominantes del día 4, 6 y 9 del ciclo, las proteínas VEGF, Flt-1 y Flk-1 serán identificadas en células de la teca y granulosa y se encontrará una diferencia significativa entre compartimiento.
2. La mayor concentración de VEGF y de sus dos receptores solubles se encontrará en el líquido folicular.
3. La expresión de la proteína VEGF y de los receptores Flt-1 y Flk-1 será mayor en células de la teca y granulosa de folículos dominantes del día 4 del ciclo estral que en los del día 6 y 9.
4. En el líquido folicular del día 9 del ciclo se encontrará la mayor concentración de sFlt-1 y sFlk-1.



## VI. DISEÑO EXPERIMENTAL



## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Animales

Con el propósito de conocer las diferencias en la presencia y concentración de las proteínas de interés por día de dominancia del ciclo, se sincronizó la ovulación de 15 vacas raza BeefMaster por medio de un

dispositivo intravaginal que libera progestágenos (CIDR) durante 9 días. En el día 7 se aplicó PGF2- $\alpha$  (Dinoprost) en dosis de 250 mg/animal, y a los 3 días de ser retirado el CIDR se aplicaron 100  $\mu$ g de GnRH (gonadorelina) (día 0), 18 horas después de la aplicación de GnRH. Todas las vacas fueron ovariectomizadas, para recuperar los ovarios con folículos dominantes del día 4, 6 y 9 del ciclo.

### *Ovariectomía*

En los animales sincronizados se identificó el folículo dominante por medio de ultrasonografía, una vez identificado se realizó la ovariectomía unilateral vía vaginal. Para obtener los ovarios, los animales fueron tratados con xilacina al 20% por vía intramuscular y 5 ml de lidocaína por cada 450 Kg de peso por vía epidural. Todo este procedimiento se llevo a cabo respetando el bienestar animal de acuerdo a NOM-062-ZOO-1999.

## **2. Procesamiento de las muestras**

Los ovarios, se lavaron con solución salina fisiológica al 0.9% (SSF; cloruro de sodio 0.9 g y agua inyectable) a

30°C, después con etanol al 70% por 30 segundos y nuevamente con SSF para eliminar el exceso de etanol. Inmediatamente después de los lavados, se disecaron los folículos dominantes (los de mayor tamaño). De ellos se obtuvo el líquido folicular (LF) con una jeringa de 5 ml aguja calibre 21 de 32 mm, el líquido folicular se centrifugó a 600 g durante 10 min, para recuperar las células de la granulosa suspendidas. El líquido folicular se centrifugó nuevamente a 12000 g durante 10 min para obtener líquido folicular libre de células, el cual se guardó a -70°C. El paquete de células de la granulosa obtenidas de la primera centrifugación del líquido folicular se resuspendió en 200 ml de PBS, y las células se juntaron con las que se recuperaron por raspado de los sacos foliculares (células de la teca y granulosa) con pinzas de disección de punta roma y haciendo un doble lavado de los mismos con 200 µl de PBS 1x (pH 7.4) cada uno, se ajustó el volumen de la suspensión celular hasta alcanzar 1000 µl de PBS y se centrifugaron a 600 g por 10 min, el sobrenadante se eliminó, y se guardó el paquete de células de la granulosa (CG) a -70°C hasta su uso. Los sacos foliculares, se lavaron dos veces más con PBS para asegurarnos que estaban libres de células de la granulosa, quedando sólo las

células de la teca (CT) y se guardaron en tubos eppendorf de 1.5 ml a -70°C hasta su uso. Estas muestras se utilizaron para realizar el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

Para demostrar la presencia de las proteínas de VEGF, Flt-1, Flk-1, sFlt-1 y sFlk-1 en CT, CG y LF se obtuvieron folículos de ovarios de rastro. Se seleccionaron para el experimento los folículos más grandes provenientes de ovarios que tuvieran un cuerpo lúteo. Los folículos se lavaron y se recuperó el LF, CG y CT, tal como se describió arriba. Estas tres estructuras fueron usadas para el análisis cualitativo de VEGF, Flt-1, Flk-1, sFlt-1 y sFlk-1 por Western blot.

### **3. Extracción y cuantificación de proteínas**

3.1 Se homogenizaron 100 mg de células de la teca y de la granulosa con 500µl de buffer de lisis contenido en el estuche comercial de ELISA (R&D Systems parte # 895347 del catálogo # DVR200), más 50 µl de cóctel inhibidor de proteasas (0.20 mM Aprotinin, 5.25 mM leupeptido, 1.8 mM pepstatin A) (# cat P2714 de Sigma). Las muestras homogenizadas se incubaron a

temperatura ambiente durante 1 hora y se guardaron a -20°C, hasta el día siguiente que se clarificaron por centrifugación a 1000 g durante 15 min a 4°C. La cuantificación de proteínas se realizó en 1 µl de muestra más 9 µl de buffer Tris (10 mM, pH 7.5), utilizando un equipo Ampliquant microcuvette (# Parte 007zz002).

3.2 Para la extracción de proteínas en CG y CT de folículos de rastro, las células se homogenizaron por separado en una proporción de 500 µl de Buffer RIPA (# cat R0278 de Sigma) por cada 100 mg de las células, aplicando 50 µl de cóctel inhibidor de proteasas. Los homogenizados se dejaron durante 30 minutos en baño de hielo y se centrifugaron a 12000 rpm durante 20 min a 4°C, se desecharon los precipitados, se recuperaron los sobrenadantes y se cuantificaron las proteínas por el método de *Lowry (1951)*.

Debido a que el buffer RIPA interfiere con el método de *Lowry*, se tomaron 10 µl de cada uno de los sobrenadantes (células teca y granulosa) a los cuales se les agregó 1 ml de Ácido Tricloroacético al 5%, cada muestra se dejó 10 min en hielo, posteriormente se

centrifugó la muestra a 10000 rpm durante 15 min a 4°C, el sobrenadante se eliminó y el precipitado proteico se resuspendió en 100 µl de NaOH 0.4 N. Después de esto se tomaron 10 µl de cada pastilla resuspendida y se llevó a cabo la cuantificación (*Martínez, 1998*).

#### **4. Dot Blot**

Esta técnica se realizó con el propósito de verificar la efectividad de los anticuerpos elegidos para cada una de las proteínas de interés (VEGF, Flt-1, Flk-1, sFlt-1 y sFlk-1), e identificar la fracción en la cual lográbamos la extracción de cada proteína. Los sobrenadantes de las CT y CG (sobrenadantes 1) obtenidos después de centrifugar los homogenizados, tal como se describe en el inciso 3.2, se recuperaron y los precipitados de los dos tipos de células se resuspendieron en 150 µl de RIPA con cóctel inhibidor. Se tomaron 15 µl de estos precipitados resuspendidos (precipitado 1), se guardaron, y posteriormente la cantidad sobrante de los precipitados se volvió a homogenizar y se incubó 15 minutos en hielo, posteriormente se centrifugó a 12000 rpm durante 20 min a 4°C y se guardaron los

sobrenadantes (sobrenadantes 2) obtenidos para ser utilizados. Se tomaron 15  $\mu$ l de la suspensión celular de CT y CG de los dos sobrenadantes obtenidos y del líquido folicular (dilución 1:100) se pusieron en cada pozo de la unidad de dot blot (cabezal de microfiltración); en medio de la unidad estaba el papel de nitrocelulosa, el cual se dejó secar. A continuación se incubaron con los anticuerpos primarios a una dilución 1:500, Anticuerpo monoclonal anti VEGF-R2 producido en ratón (# cat V9134 de Sigma), monoclonal anti-human VEGF-R1 (# MAB321 de R&D Systems) y anticuerpo policlonal de conejo anti- VEGF (isotipo IgG # cat sc-152 de Santa Cruz). Posteriormente se hicieron cuatro lavados con PBS tween, se les agregó el segundo anticuerpo peroxidado utilizando una dilución 1:1000 (de cabra, anti-conejo, conjugado con peroxidasa # cat sc-2004 de Santa Cruz) y cabra anti-ratón, conjugado con peroxidasa (# cat sc-2005 de Santa Cruz). Posteriormente se lavaron cuatro veces las membranas con PBS tween y se revelaron con diaminobenzidina.

## 5. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Cuarenta  $\mu\text{g}$  de proteína de CT y CG, 5  $\mu\text{l}$  de LF (dilución 1:100) se examinaron por electroforesis en geles de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) de acuerdo a la técnica descrita por *Laemmli (1970)*. Se corrieron geles de poliacrilamida al 10% para separar las proteínas de menor peso molecular y al 8% para las proteínas de mayor peso molecular. En un carril independiente se aplicaron 5  $\mu\text{l}$  de marcadores de peso molecular (Kaleidoscope Prestained Standards # 161-0324 BioRad) cuyo rango de pesos moleculares es de 7.039-198,367 kDa.

Finalizada la electroforesis, el gel se tiñó con azul de Coomassie durante 1 hora. Posteriormente se colocó en solución desteñidora (metanol 5%, ácido acético 10% y agua) hasta que se visualizaron las bandas bien definidas. Por el peso molecular se verificó que estuvieran presentes las bandas de interés, el peso de cada una de las proteínas de interés se muestra en el cuadro 2.



**Cuadro 2.** Peso molecular de las proteínas de interés en el trabajo.

<b>Proteína</b>	<b>Peso Molecular (PM)</b>	<b>Autor</b>
<b>VEGF</b>	45 kDa	<i>Ulger et al., 2000</i>
<b>Flt-1</b>	180 kDa	<i>Podar y Anderson, 2005</i>
<b>Flk-1</b>	230 kDa	<i>Podar y Anderson, 2005</i>
<b>sFlt-1</b>	85 kDa	<i>Kendall y Thomas, 1993</i>
<b>sFlk-1</b>	75 kDa	<i>Meissner et al., 2004</i>

## **6. Inmunoelctrotransferencia (Western Blot) para analizar VEGF, Flt-1, Flk-1 y sFlt-1**

La inmunoelctrotransferencia se llevó a cabo según la técnica de *Towbin et al (1979)*. Se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de Nitrocelulosa en un sistema semi-húmedo aplicando 400 miliamperios durante cincuenta minutos. Se utilizó como amortiguador de transferencia 20 ml de metanol, 20 ml solución de transferencia 1x (solución de transferencia: (Tris, glicina, agua y se ajusta el pH a 8.3) y 60 ml de agua destilada. Las membranas de nitrocelulosa se incubaron con 5 g de leche Carnation light y 100 ml de PBS tween al 0.05% durante una hora para realizar el bloqueo. A continuación se incubaron con los

anticuerpos primarios que se mencionaron anteriormente. Posteriormente se hicieron cuatro lavados con PBS tween, se les agregó el segundo anticuerpo peroxidado utilizando una dilución 1:5000. Se hicieron 4 lavados con PBS tween y por último se hizo el revelado por quimioluminiscencia.

## **7. Revelado por quimioluminiscencia**

Se utilizó el estuche comercial Amershan ECL (Western Blotting Detection Reagents # RPN2132). La membrana de nitrocelulosa se cubrió con 2 ml de las soluciones 1 y 2. Posteriormente se colocaron en las membranas de plástico y se montaron en el cassette radiográfico. La placa de radiografía se expuso durante 1 minuto con la membrana de nitrocelulosa, se sumergieron en solución reveladora --hasta que se observaron las bandas--, se lavó con agua, se expusieron a la solución fijadora durante un minuto y finalmente se dejó secar.

## **8. ELISA (*Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas*) para VEGF, Flt-1 Flk-1 y sFlt-1**

Para la determinación cuantitativa de las proteínas VEGF, Flt-1 Flk-1 y sFlt-1 se realizó la prueba de ELISA con estuches comerciales. Para determinar VEGF en homogenizados de CG y CT y en líquido folicular se empleó el estuche Human VEGF Inmunoassay (# cat DVE00 R&D Systems). Para Flt-1 en homogenizados de CG y CT sFlt-1 en líquido folicular se usó el Human soluble VEGF R1/ Flt-1 Inmunoassay (# cat DVR110B R&D System). Finalmente el Human soluble VEGFR2 Inmunoassay (# cat DVR200 R&D Systems) se usó para determinar Flk-1 en homogenizados de CG y CT y sFlk-1 en líquido folicular.

Las precisiones inter-ensayo de las ELISAS para VEGF y Flt-1 fueron de 2.87% y 8.99% respectivamente.

## **9. Análisis Estadístico**

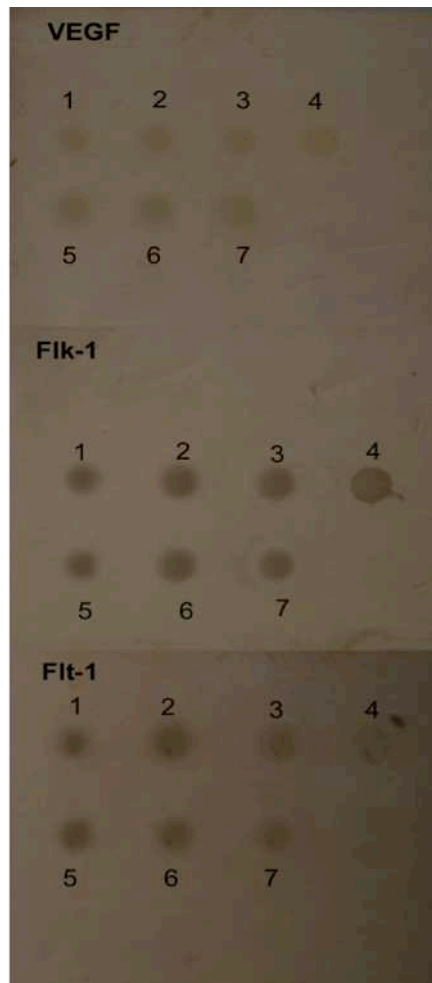
La diferencia en la concentración de VEGF, Flt-1 y sFlt-1 en CT, CG y LF se analizó por ANOVA teniendo como variable explicatoria día, compartimiento e interacción.

Para analizar la diferencia de la concentración de las proteínas VEGF y sFlt-1 en LF, se tomaron como variables explicatorias día del ciclo. Los datos obtenidos fueron transformados al logaritmo natural para corregir la heterocedasticidad de las varianzas. Este análisis se realizó con el paquete estadístico GenStat4.

## **VIII. RESULTADOS**

### **8.1 Prueba de los anticuerpos**

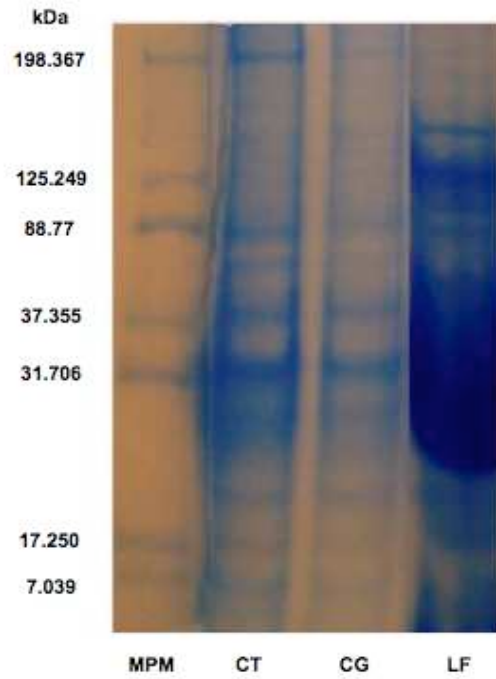
En los Dot Blot realizados se observa que las proteínas VEGF, Flt-1 y Flk-1 están presentes en diferentes sobrenadantes y precipitado proteico. En los sobrenadantes 1 y los precipitados 1 obtenidos de los homogenizados de las CT y CG es más clara la presencia de cada una de las proteínas estudiadas. Estas proteínas no solo están presentes en las células sino también en LF, tal cual como se observa en la figura 1.



**Figura 1. Reconocimiento de proteínas por Dot Blot.** 1. Sobrenadante 1 de CT, 2. Precipitado de CT, 3. Sobrenadante 2 CT, 4. Sobrenadante 1 CG, 5. Precipitado CG, 6. Sobrenadante 2 CG y 7. LF.

## **8.2 Determinación del patrón de proteínas en folículos de rastro**

En las CT y CG aparecen, bandas cuyo peso molecular corresponden a Flt-1 (180 kDa) y Flk-1 (230kDa). En contraste, el LF presentan bandas de 75 y 85 KDa que corresponde a sFlk-1 y sFlt-1 respectivamente. Además en CT, CG y LF se observa una banda cuyo peso es de 45 kDa que corresponde a VEGF (Figura2).

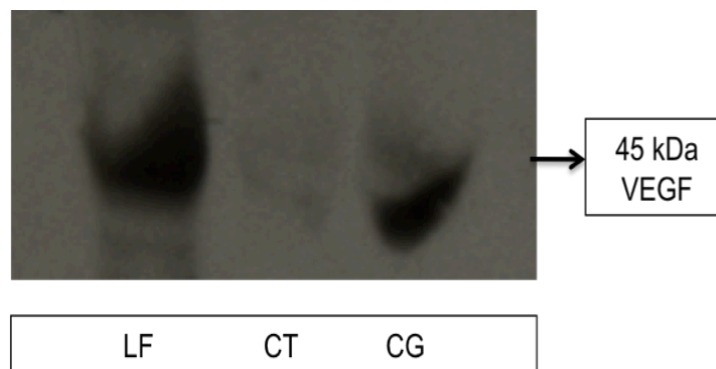


**Figura 2. Electroforesis en geles al 8% de poliacrilamida SDS-PAGE de homogenizados de CT, CG y LF obtenidos de folículos de rastro.** MPM. Marcador de peso molecular, CT. 40  $\mu\text{g}$  de proteínas de células de teca, CG. 40  $\mu\text{g}$  de proteínas de células de la granulosa y LF. Dilución 1:10 líquido folicular.



### 8.3 Inmunolocalización de las proteínas VEGF, Flt1, Flk-1, sFlt-1 y sFlk-1 en CT, CG y LF de folículos de rastro

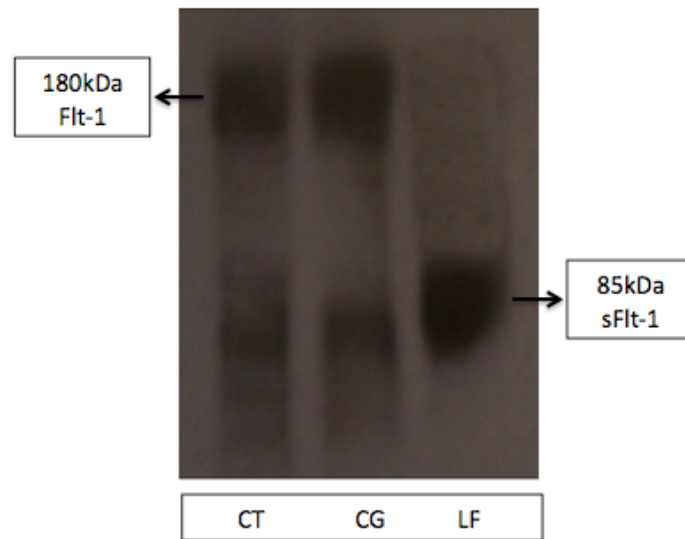
En la figura 3 se observaron bandas con peso de 45 kDa que corresponde a VEGF en CT, CG y LF. Las células de la teca tienen una menor intensidad que en CG y LF.



**Figura 3. Detección de VEGF en LF, CT y CG de folículos de rastro.** LF. Líquido folicular, CT. Células de la teca y CG. Células de la granulosa. En LF y CG se observa la proteína de VEGF más tenue que en CT.

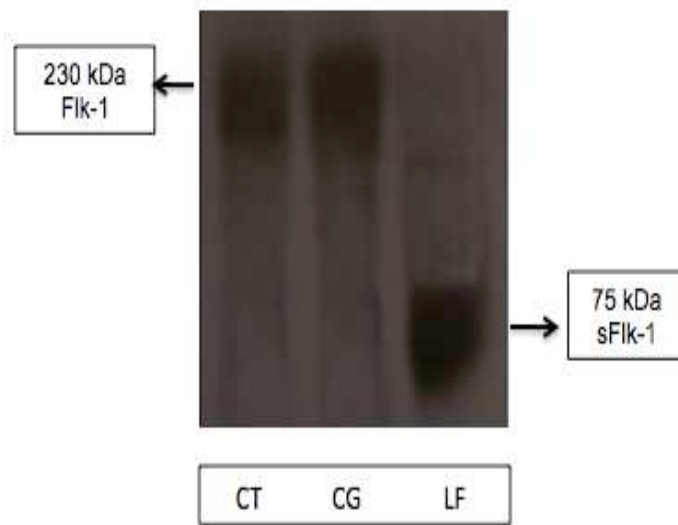
En CT y CG se observaron bandas con peso molecular de 180 kDa que corresponde a Flt-1 y de 85 kDa

correspondiendo a sFlt-1. Sin embargo en LF solo se observó la banda correspondiente al peso molecular de sFlt-1 (Figura 4).



**Figura 4. Detección de Flt-1 y sFlt-1 en CT, CG y LF.** CT. Células de la teca, CG. Células de la granulosa y LF. Líquido folicular. En CT y CG se detectó la proteína completa y la soluble de Flt1, en LF se observa únicamente la proteína de sFlt-1.

En CT y CG se observaron bandas de 230 kDa y 75 kDa, correspondiendo a los receptores Flk-1 y sFlk-1 respectivamente (Figura 5). En CT y CG la banda del receptor soluble es muy tenue en comparación con la que se observa en LF, en cuyo caso la banda de 75 kDa es más evidente.



**Figura 5. Detección de Fik-1 y sFik-1 en CT, CG y LF de folículos de vacas.** CT. Células de la teca, CG. Células de la granulosa y LF. Líquido folicular. En CT y CG se observa una banda muy clara de 230 KDa y una muy tenue de 75 KDa correspondiendo a la proteína de Fik-1 y sFik-1 respectivamente. En LF, como era de esperar, solo se detectó la proteína de 75 KDa correspondiente a sFik-1.

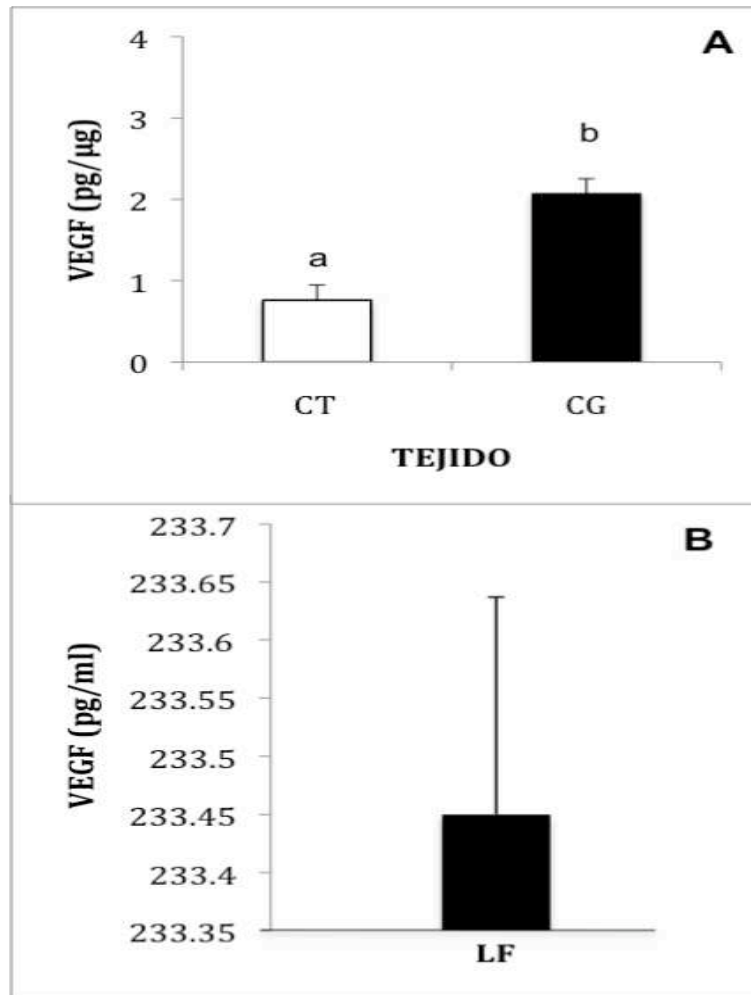
#### **8.4 Concentración de VEGF, Flt-1, Flk-1, sFlt-1 y sFlk-1 en CT, CG y LF de los folículos obtenidos de vacas sincronizadas**

La concentración de la proteína VEGF se presenta en las figuras 6A-B. En CG hay el doble de concentración de la proteína del ligando que en CT. En LF la concentración de VEGF es más altas que en las células. No hubo diferencia ( $P>0.05$ ) por el día de dominancia de los folículos, y tampoco se presentó interacción de día del ciclo y compartimiento celular.

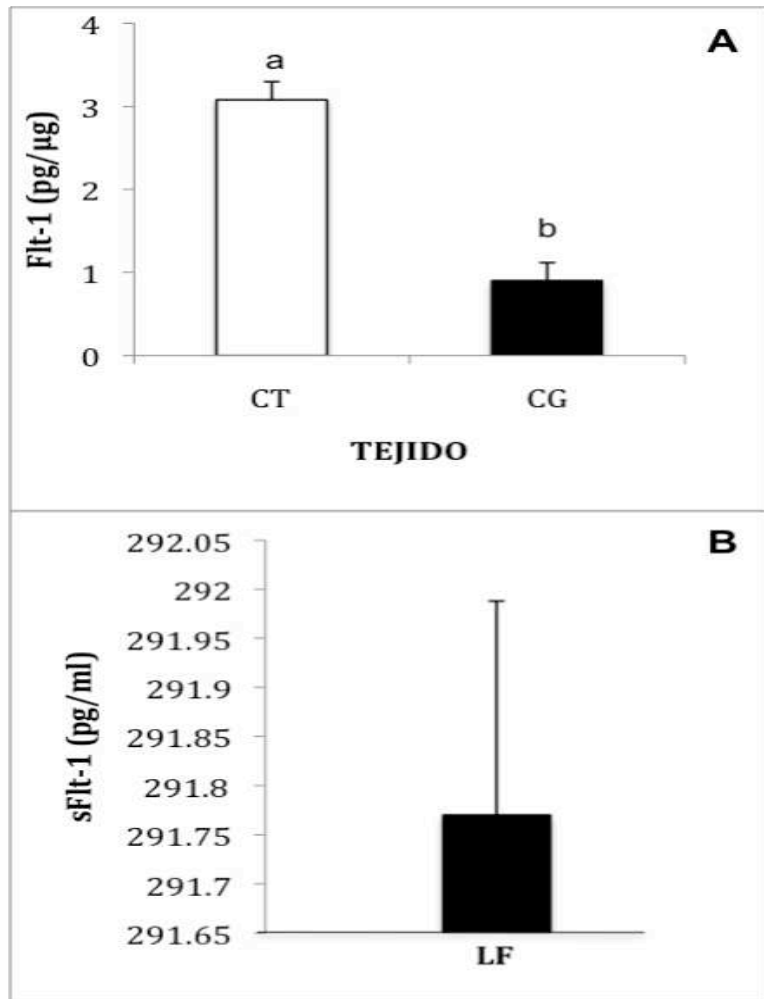
No fue posible detectar la concentración de Flk-1 en homogenizados de CT y CG, ni sFlk-1 en LF, debido a que los valores de estas proteínas estuvieron por debajo del límite inferior de detección de la curva estándar calculada en el ensayo de ELISA.

En la figura 7A-B se muestran los resultados de la concentración de Flt-1 en CT, CG y sFlt-1 en LF de folículos de vacas de los días 4, 6 y 9 del ciclo estral. El

análisis estadístico de Flt-1 y sFlt-1 mostró diferencia significativa por día de dominancia del folículo y por tejido ( $P < 0.005$ ), aunque en la interacción de variables no hubo diferencia significativa. La mayor concentración de Flt-1 se encontró en los folículos del día 4 y las CT presentan concentraciones de Flt-1 tres veces más altas que las CG. En LF se detectó sFlt-1 y en los folículos dominantes del día 4 del ciclo se encontró la mayor concentración, aproximadamente 400 pg/ml. Aunque no hubo una interacción en los días de dominancia y el tejido, como se mencionó en la figura 8A, se muestra el promedio de la concentración de la proteína Flt-1 que resultó de sumar las células de la teca y de la granulosa en los diferentes días en que se tomaron los folículos. Estos resultados nos demuestran que la concentración de la proteína disminuye el triple en el día 6 y en el día 9 vuelve a aumentarse casi dos veces la proteína ( $P < 0.001$ ). En la figura 8B se puede observar que las concentraciones de sFlt-1 en líquido folicular presentan un comportamiento parecido a la proteína de Flt-1 en el día 4 la concentración de la proteína de sFlt-1 es más alta, la concentración disminuye al doble el día 6 y se mantiene constante en el día 9 del ciclo ( $P < 0.001$ ).

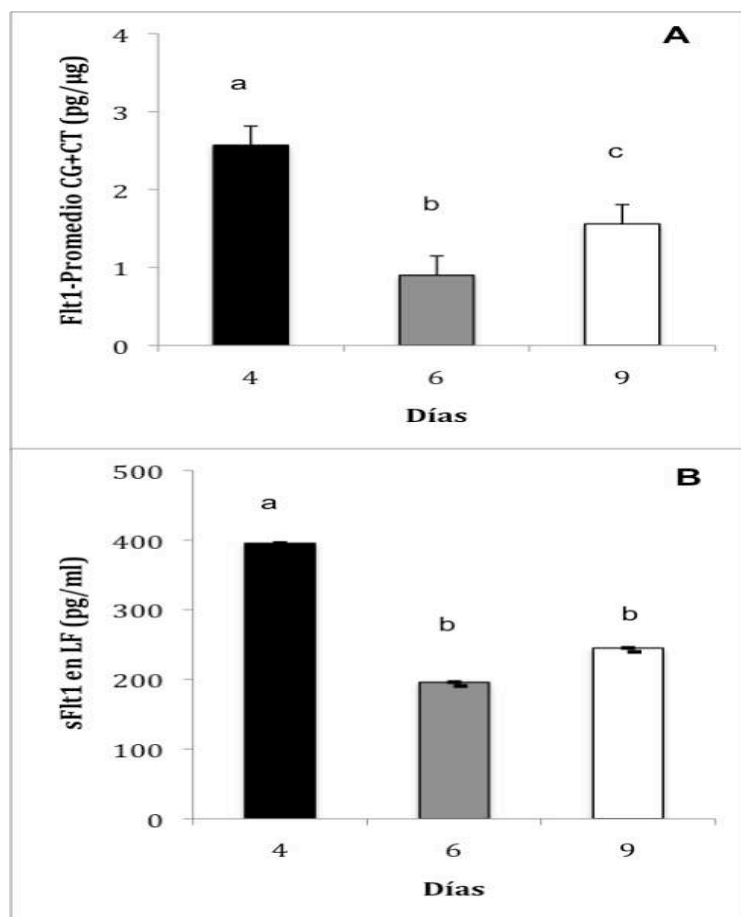


**Figura 6. Concentración de la proteína de VEGF. Paneles A-B.** Concentración de la proteína VEGF en CT y CG., LF respectivamente. Los datos graficados muestran el promedio  $\pm$  SD, diferentes letras, representan diferencia significativa.



**Figura 7. Concentración de la proteína Flt-1. Panel A.** Concentración de la proteína de Flt-1 en CT y CG, **Panel B.** Concentración de la proteína de sFlt-1 en LF. Los datos graficados muestran el promedio  $\pm$  SD, diferentes letras, representan diferencia significativa.





**Figura 8. Concentración de la proteína FIt-1 por día de dominancia.**  
**Panel A.** Promedio de la concentración de la proteína de FIt-1 en CT + CG los días 4, 6 y 9 del ciclo estral. **Panel B.** Concentración de la proteína sFIt-1 en LF los días 4, 6 y 9 del ciclo. Los datos graficados muestran el promedio  $\pm$  SD, diferentes letras, representan diferencia significativa.

## IX DISCUSIÓN

En el presente trabajo se identificaron y cuantificaron las proteínas VEGF y Flt-1 en CT, CG y LF de folículos ováricos de vacas. Pudimos demostrar que independientemente del día de dominancia de los folículos, las CG son la principal fuente de VEGF y las CT de Flt-1, no obstante en LF fue donde se encontró la concentración más alta de VEGF. Adicionalmente, los resultados de este trabajo, permiten por primera vez demostrar la presencia de las proteínas de los receptores solubles para VEGF, sFlt-1 y sFlk-1 en CT, CG y LF, siendo el LF el de mayor concentración de ellos. Estos resultados confirman la hipótesis en cuanto a que, la proteína de VEGF y Flt-1 están en CT y CG y que la concentración entre compartimientos es diferente, que la mayor concentración de VEGF y sFlt-1 está en líquido folicular, sin embargo no se confirma que el día de dominancia tenga efecto en la concentración de VEGF y Flt-1, porque de acuerdo al resultado sólo tuvo efecto para Flt-1 pero no para VEGF y tampoco se comprobó que en el día 9 del ciclo exista la mayor concentración de sFlt-1.

Los experimentos de Western blot permitieron conocer que VEGF está presente en CT, CG y LF y Flt-1, Flk-1 en CT y CG de folículos ováricos de vaca. También se demostró la existencia de las formas solubles de los receptores Flt-1 y Flk-1, en CT, CG y de manera mucho más abundante en LF. La proteína y el ARNm de VEGF han sido encontrados por otros autores en folículos de cerdas, ovejas y vacas y se ha visto que esta proteína es indispensable para mantener la salud de los folículos (Ferrara y Smyth, 1997; Plendl, 2000). Autores como *Danforth et al. (2003)* y *Grasselli et al. (2003)* han encontrado la proteína VEGF en CG, también se ha visto la proteína en LF de bovinos y cerdas (*Grazul-Bilska et al., 2007; Shimizu et al., 2003*) y en células de la teca y cuerpo lúteo en bovino (*Greenaway et al., 2004*). *Otani et al. (1999)* reportaron la presencia de la proteína VEGF en CG y CT de mujeres. Estudios realizados sobre la proteína y el ARNm de Flt-1, demuestran la presencia de la proteína Flt-1 en CG de humanos (*Antczak y Van Blerkorn, 2000*). *Otani et al. (1999)* encontraron la proteína Flt-1 en CG y CT de folículos humanos. En cuerpo lúteo, CG, teca interna y en el complejo cumulus-oocito de cerdas y bovinos se observó la expresión del ARNm y la proteína del

receptor Flt-1 (*Ribeiro et al., 2007; Berisha et al., 2000a; Einspaner et al., 2002*). La proteína y el ARNm del receptor Flk-1 se ha encontrado en CL de cerdas (*Ribeiro et al., 2007*); en trabajos realizados con CT, CG, complejo del cumulus-oocito y teca interna en cerdas y bovinos se expresa la proteína Flk-1 (*Ribeiro et al., 2007; Shimizu et al., 2003; Berisha et al., 2000a; Einspaner et al., 2002*). Nuestros resultados coinciden con lo previamente reportado y descrito ya que la proteína de VEGF se encontró en las células de la teca, de la granulosa y líquido folicular; las proteínas de Flt-1 y Flk-1 se encontraron en células de la teca y de la granulosa. Con anterioridad a nuestro trabajo no se había realizado un ensayo con los tres compartimentos foliculares a la vez (CT, CG y LF) para observar la presencia de las proteínas VEGF, Flt-1, Flk-1 y los receptores solubles en folículos dominantes de vaca.

Los receptores sFlt-1 y sFlk-1, que en humanos resultan del corte y empalme alternativo del preARNm de los transcritos de los genes Flt-1 y Flk-1, no habían sido detectados en ningún tejido de bovino. En cerdas muy recientemente se encontró el ARNm de sFlt-1 en el endometrio de hembras gestantes y en el cuerpo lúteo

de gestantes y vacías. Se ha propuesto que sFlt-1 pudiera jugar un importante papel en la remodelación tisular que debe ocurrir para que se dé la implantación (*Kaczmarek et al., 2009*). En humanos es donde hay más estudios acerca de la función negativa que ejerce sFlt-1. Se ha encontrado que al incubarse células umbilicales (HUVECs) con 30% de líquido folicular humano hay un aumento en la concentración de sFlt-1. Además este receptor es secretado en la placenta y puesto a circular libremente durante el embarazo, donde se ha demostrado que el aumento de los niveles de sFlt-1 se relaciona con la presencia de preeclampsia (*Grummer et al., 2005*). A este receptor no se le atribuye únicamente un efecto negativo en fisiopatologías de mujeres embarazadas sino también en patologías de córnea y síndrome de hiperestimulación ovárica (*Thomas et al., 2007*). Sobre el receptor soluble Flk-1 se sabe poco y es controversial la información, lo único claro es que juega un papel antiangiogénico. En un estudio reciente se reporta que no hubo diferencia significativa en la concentración de sFlk-1 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 de Flk-1 en células endoteliales y células de Houfbauer placentarias de mujeres con preeclampsia con más de 34 semanas de gestación. Es decir, la expresión alterada de Flk-1 en células endoteliales y de Houfbauer en mujeres con preeclampsia altera las funciones de VEGF en el desarrollo placentario y nos explica la disminución de Flk-1 y sFlk-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 lo obtenido del estudio de *Tripathi et al 2009* podríamos suponer que en los folículos las cantidades de Flk-1 y sFlk-1 al verse disminuidas impedirían la actividad de VEGF en las células de teca y granulosa, y probablemente estas células empezarían a sufrir un proceso de atresia por la baja interacción entre VEGF y Flk-1.

La concentración de VEGF no mostró un cambio significativo entre los folículos obtenidos en el día 4, 6 y 9 del ciclo, sin embargo la diferencia sí fue significativa

entre tejidos. El LF es el sitio donde se detectó la mayor concentración de VEGF, seguida de las CG y por último las CT. Los capilares de las CT empiezan a ser hiperpermeables alrededor de la ovulación en muchos mamíferos, en folículos de bovino y porcino esto está acompañado por un incremento en la expresión de VEGF en CG y una alta acumulación de la proteína VEGF en LF. Los altos niveles de VEGF en LF de folículos preovulatorios parecen difundirse hacia las capas celulares del folículo y crear gradientes angiogénicos en CT que atraen a los vasos sanguíneos hacia las CG (*Barboni et al., 2000; Berisha et al., 2000a*). Estudios realizados con ratas (*Grasselli, 2003*) y cerdas (*Danforth, 2003*), reportan, al igual que lo encontrado en el presente trabajo, que las células de las granulosa son la mayor fuente de producción de VEGF, lo cual posiblemente implica que existe una interacción parácrina entre CG y CT, aunque también el hecho de que estén presentes los receptores de membrana Flt-1 y Flk-1 en las CG significa que VEGF tiene una acción autócrina en CG. Al respecto *Greenaway et al. (2004)* demostraron que la interacción de Flk-1 con VEGF en CG evita la apoptosis de estas células. Lógicamente encontramos que el LF es el lugar con mayor

concentración de VEGF, esto debido a que en él están resuspendidos muchos de los sustratos que se producen en CT y CG. Como se dijo antes, la presencia de VEGF en LF permite formar el gradiente necesario para la atracción de vasos sanguíneos en las tecas y con ello mantener la salud del folículo (*Berisha et al., 2000a*).

Con respecto al día de dominancia de los folículos, no pudimos demostrar diferencias significativas en las concentraciones de VEGF entre los folículos del día 4, que es cuando se establece la dominancia, día 6, que son folículos dominantes sanos, y folículos dominantes atrésicos del día 9. Sin embargo otros autores sí han demostrado diferencias significativas en las cantidades de VEGF entre folículos dominantes (estrógeno activos) y no dominantes (estrógeno inactivos), siendo los folículos dominantes los que tienen una mayor cantidad de VEGF (*Grazul-Bilska et al., 2007*). La discrepancia entre nuestro trabajo y el de estos autores puede estar en la sensibilidad de las técnicas de detección, porque mientras que nosotros usamos ELISA, los autores citados realizaron los ensayos por RIA, o bien puede ser



que la falta de diferencias significativas en la concentración de VEGF que nosotros vemos durante la dominancia de los folículos sea algo similar a lo que ocurre durante la formación y lisis del cuerpo lúteo, en donde los cambios en la angiogénesis del cuerpo lúteo se deben principalmente a diferencias en la expresión de los receptores para VEGF y no a diferencias en la concentración del ligando (*Berisha et al., 2000a*). Una situación similar ocurre con las concentraciones de VEGF en sangre de mujeres gestantes con y sin preclampsia, en las cuales esta patología está más relacionada con la diferencia en la concentración de receptores solubles y de membrana que en la concentración de VEGF entre estas mujeres (*Tripathi et al., 2009*).

VEGF ejerce sus propiedades angiogénicas, de proliferación, migración y supervivencia de las células endoteliales (*Ulger et al., 2000; Harper y Bates, 2008*) a través de dos receptores tipo tirosina cinasa; Flt-1 ó VEGFR-1 y Flk-1 ó VEGFR-2; de estos, Flk-1 es el mayor mediador de todos los efectos de VEGF, sin embargo su concentración en los diferentes tejidos es

hasta 10 veces menos que Flt-1 (*Waltenberger et al., 1994; Zeng et al., 2001*). Lo anterior puede ser el motivo por el cual, ante la misma cantidad que pusimos de proteína en cada ensayo de ELISAS para Flt-1 y Flk-1, pudimos medir la concentración de Flt-1, pero no la de Flk-1 ni sFlk-1, no obstante que por Western blot pudimos demostrar que en vacas, Flk-1 y sFlk-1 están presentes en CG y CT y en LF, sFlk-1.

La falta de resultados de concentración de los receptores Flk-1 y sFlk-1 hace difícil interpretar cabalmente los resultados obtenidos para los receptores Flt-1 y sFlt-1, debido a que como mencionan algunos autores (*Kaczmarek et al., 2005*) el funcionamiento de VEGF requiere de un fino equilibrio entre el ligando y sus receptores.

Este es el primer reporte de sFlt-1 en LF de animales de granja. Resulta difícil explicar por qué en los folículos del día 4 del ciclo se tiene la mayor concentración de Flt-1 y sFlt-1 en comparación con los folículos dominantes del día 6. Los folículos del día 4 y 6 del

ciclo, que se espera estén en el establecimiento y ejercicio de su dominancia, respectivamente, deben ser folículos con una apropiada irrigación y protección de sus células de la granulosa para evitarles la apoptosis, lo cual según parece por nuestros resultados sólo demanda del receptor Flt-1 para el establecimiento pero no para el ejercicio de la dominancia. Probablemente esto último ocurra como consecuencia de la interacción de VEGF con el receptor Flk-1. Existen reportes que muestran una función diferencial entre los receptores de VEGF; a Flt-1 se le ha catalogado como receptor “anzuelo ó señuelo” (*Kendall et al., 1996*), debido a que tiene una alta afinidad por el ligando pero una baja capacidad de autofosforilación y de transmisión de señales (*Zeng et al., 2001*), sin embargo también hay autores que le han atribuido funciones muy similares a las de Flk-1; en la proliferación celular, quimiotaxis (*Matsumoto et al., 2002*) y en la sobrevivencia celular (*LeCouter et al., 2003*).

Se ha visto que en condiciones fisiológicas, los folículos dominantes presentan una alta expresión de ARNm del Flt-1 y Flk-1 (*Berisha et al., 2000b*). Existe poca y

contradictoria información alrededor de la regulación de la expresión de los receptores de VEGF. Según *Shimizu et al. (2003)*, la expresión del gen Flt-1 se incrementó más que Flk-1 en células de la teca cuando VEGF fue sobreexpresado en las células de la granulosa por la inyección de fragmentos de este gen, sin embargo años después este mismo autor encuentra que la expresión de Flk-1 es estimulada en ratas por la aplicación del gen de VEGF, mientras que Flt-1 no tuvo cambios significativos, lo que indica que VEGF estimula la producción de Flk-1, pero no la de Flt-1 para ejercer sus funciones angiogénicas, y que Flt-1 parece ser estimulado por un medio distinto (*Shimizu et al., 2007*). Lo anterior indica que se requiere de un adecuado nivel de VEGF en forma libre para estimular la síntesis de Flk-1 en las células endoteliales y de la granulosa, tal como otros autores lo han mencionado (*Maynard et al., 2003; Reuvekamp et al., 1999*). Lo que podemos decir con respecto a nuestros resultados es que probablemente la caída que ocurre en la concentración de Flt-1 en el día 6 del ciclo provoca una mayor concentración de VEGF libre, el cual estimula la síntesis de Flk-1 y con ello se logra mantener la angiogénesis del folículo, ya que según la bibliografía (*Ginther et al.,*

1989b; Fortune et al., 2001) en este día del ciclo los folículos dominantes están sanos. El patrón de la concentración de sFlt-1 en LF es muy similar al que presentó el receptor de membrana, lo cual puede significar que este receptor soluble cumple con la función de competencia con Flt-1 por el ligando y de ambos con el receptor Flk-1.

Las células de la teca fueron la mayor fuente de la proteína Flt-1. La mayor producción de VEGF en CG y de Flt-1 en células de la teca que nosotros reportamos aquí apoyan los resultados de Shimizu et al. (2003), ellos realizaron un trabajo inyectándole fragmentos del gen de VEGF en ovarios de cerdas miniaturas, seguido por un tratamiento con gonadotropina coriónica equina (eCG) para estimular el crecimiento folicular. Para confirmar la sobreexpresión del gen de VEGF después de la inyección, se evaluó la expresión de las isoformas VEGF 121 y 164 en CG y la expresión de Flt-1, Flk-1 y la densidad de las redes capilares en CT. Las CT y CG fueron tomadas de folículos con un diámetro mayor a 4 mm para detectar la expresión del ARNm de las isoformas de VEGF, Flt-1 y Flk-1, en las CG y CT

respectivamente mediante una PCR semi-cuantitativa. En este trabajo se encontró que al haber una sobreexpresión del ARNm de VEGF en células de la granulosa se produce un aumento del ARNm de Flt-1 en células de la teca.

VEGF es el regulador más importante de la angiogénesis, además de esto se le relaciona con la protección celular, y su función es mantener la integridad del folículo protegiendo las células de la muerte. En los resultados se obtuvo, como se mencionó anteriormente, que no hay diferencia en la concentración de la proteína VEGF durante los 3 días del ciclo estral en que fueron colectados los folículos. Con lo anterior se puede pensar que VEGF se ve modificado por la presencia de los receptores y que es un factor importante para mantener la dominancia de los folículos (*Yin-Shang, 2005*).

## **X CONCLUSIONES**

En este trabajo se demuestra por primera vez la presencia de VEGF, sus receptores de membrana Flt-1 y Flk-1, y los receptores solubles sFlt-1 y sFlk-1 en los tres compartimientos a la vez (CT, CG y LF), además también se demuestra por primera vez la presencia de sFlt-1 y sFlk-1 en CT, CG y LF en folículos de vaca.

El tejido folicular que tiene la mayor concentración VEGF son las células de la granulosa, sin embargo las células de la teca es donde se encuentra la mayor concentración de Flt-1, lo cual indica la posible acción parácrina de VEGF, además de su acción autócrina.

El día de dominancia de los folículos, sólo tuvo efecto significativo en la concentración de los receptores Flt-1 y sFlt-1 pero no en la de VEGF en ningún compartimento folicular, lo cual significa que la regulación del proceso, en este caso, ocurre por las variaciones en los receptores y no en el ligando.

## XI BIBLIOGRAFÍA

1. Adams GP. 1999. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants". *J. of Reprod and Fert supplement*. 54:17-32.
2. Antczak M y Van Blerkom J. 2000. The vascular character of ovarian follicular granulosa cells: phenotypic and functional evidence for an endothelial-like cell population. *Hum Reprod*. 15:2306-2318.
3. Arai K, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N, Yokota T. 1990. Cytokines Co-ordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem*.59:783-789.
4. Bao B y Garverick HA. 1998. Expression of steroidogenic enzymes and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J. Anim. Sci*. 76:1903–1921.
5. Barboni B, Turriani M, Galeati T, Spinaci M, Bacci ML, Forni M, Mattioli M. 2000. Vascular endothelial growth factor production in growing pig antral follicles. *Biol. Reprod*. 63: 858-864.
6. Berisha B, Schams D, Kosmann M,



- Amselgruber W, Einspanier R. 2000. Expression and tissue concentration of vascular endothelial growth factor, its receptors and localization in the bovine corpus luteum during estrous cycle. *Biol Reprod.* 63: 1106-1114.
7. Blondin P, Dufour M, Sirard MA. 1996. Analysis of atresia in bovine follicles using different methods: flow cytometry, enzyme-linked immunosorbent assay, and classic histology. *Biol Reprod.* 54:631-7.
  8. Burns DS, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Knight PG, Ireland JJ. 2005. Numbers of antral Follicles during Follicular Waves in Cattle: Evidence for High Variation Among Animals, Very High Repeatability in Individuals, and an Inverse Association with Serum Follicle-Stimulating Hormone Concentrations. *Biol of Reprod.* 73: 54–62.
  9. Chun SY, Eisenhauer KM, Minami S, Billig H, Perlas E, Hsueh AJ. 1996. Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinol.* 137(4):1447-56.
  10. Conti M, Hsieh M, Park JY, Su Y-Q. 2006.

- Role of the epidermal Growth Factor Network in Ovarian Follicles. *Mol Endocrinol.* 20(4): 715-723.
11. Cushman RA, DeSouza JC, Hedgpeth VS, Britt JH. 2001. Alteration of activation, growth, and atresia of bovine preantral follicles by long-term treatment of cows with estradiol and recombinant bovine somatotropin. *Biol Reprod.* 65:581-6.
  12. Danforth DR, Arbogast LK, Ghosh S, Dickerman A, Rofagha R, Friedman CI. 2003. Vascular endothelial growth factor stimulates preantral follicle growth in the rat ovary. *Biol Reprod.* 68:1736-41.
  13. Dissen GA, Romero C, Newman A, Ojeda S. 2001. Nerve Growth Factor is required for early follicular Development in the mammalian Ovary. *Endocrinol.* 142, 5.
  14. Dyck MK, Parlow AF, Sénéchal J-F, Strard ,M-A, Porhler F. 2001. Ovarian expression of human insulin- like growth factor I in transgenic mice results in cyst formation. *Mol Reprod and Develop.* 59: 178-185.
  15. Einspanier R, Schonfelder M, Muller K, Stojkovic M, Kosmann M, Wolf E, Schams D.

2002. Expression of the vascular endothelial growth factor and its receptors and effects of VEGF during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes (COC). *Mol Reprod and Develop.* 62 29-36.
16. Evans AC, Fortune JE. 1997. Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. *Endocrinol.*138:2963-71.
17. Ferrara N y Davis-Smyth T. 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrinol Rev.* 18: 4-25.
18. Ferrara N, Frantz G, LeCouter J, Dillard-Telm L, Pham T, Draksharapu A, Giordano T, Peale F. 2003. Differential Expression of the Angiogenic Factor Genes Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Endocrine Gland-Derived VEGF in Normal and Polycystic Human Ovaries. *American J of Pathology*, Vol. 162.
19. Ferrara N.2004. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. *Endocrine Reviews* 25(4): 581–611.
20. Findlay JK, Drummond AE, Dyson M, Baillie

- AJ, Robertson DM, Ethier JF. 2001. Production and actions of inhibin and activin during folliculogenesis in the rat. *Mol Cell Endocrinol.* 30;180:139-44.
21. Fortune JE. 1994. Ovarian Follicular Growth and Development in Mammals. *Biol of Reprod.* 50, 225-232.
  22. Fortune JE, Rivera MG, Evans ACO, Turzillo AM. 2001. Differentiation of Dominant versus Subordinate Follicles in Cattle. *Biol of Reprod.* 65, 648–654.
  23. Fortune JE, Rivera MG, Yang MY. 2004. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Animal Reproduction Sci.* 82-83:109-126.
  24. Fraser HM y Wulff C. 2003. Angiogenesis in the corpus luteum. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 1: 1 – 8.
  25. Geva E y Jaffe RB. 2000. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. *Fertility and Sterility;* 74:429-438.
  26. Ginther OJ, Kastelic JP, Knopf L. 1989. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim*

Reprod Sci. 20:187- 200.

27. Glister C, Kemp CF, Knight PG. 2004. Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. *Reproduction*. 127(2):239-54.
28. Goede V, Schmidt T, Kimmina S, Kozian D, Augustin HG. 1998. Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. *Lab Invest*. 78:1385-1394.
29. Grazul-Bilska AT, Navanukraw C, Johnson ML, Vonnahme KA, Ford SP, Reynolds LP, Redmer DA. 2007. Vascularity and expression of angiogenic factors in bovine dominant follicles of the first follicular wave.
30. Greenaway J, Gentry PA, Feige JJ, LaMarre J, Petrik JJ. 2005. Thrombospondin and Vascular Endothelial Growth Factor Are Cyclically Expressed in an Inverse Pattern During Bovine Ovarian Follicle Development. *Biol of Reprod*. 72:1071–1078. *J. Anim. Sci*. 85: 1914-1922.
31. Gutman MD, Barak V, Maslovitz S, Amit A, Lessing JB, Geva E. 2006. Regulation of vascular

endothelial growth factor- A and its soluble receptor sFlt1 by luteinizing hormone in vivo: Implication for ovarian follicle angiogenesis. Fertility and Sterility. Vol 89 No. 4.

32. Hamilton SA, Garverick HA, Keisler DH, Xu ZZ, Loos K, Youngquist RS, Salfen BE. 1995. Characterization of ovarian follicular cysts and associated endocrine profiles in dairy cows. Biol Reprod. 53(4):890-8.
33. Hadley ME, 1999. Endocrinology. Estados Unidos. Ed. Carrie Brandon.
34. Hellmut G y Augustin PD. 2000. Vascular morphogenesis in the ovary. Bailliere's Clinical Obstetric and Gynecology; 14: 867-882.
35. Hernandez RE, Kurwitz A, Payne DW, Dharnajan AM, Purcgio FA, Adasi YE. 1990. Transforming growth factor  $\beta$ 1 inhibits ovarian androgen production: gene expression, cellular localization, mechanisms(s) and site (s) of action. Endocrinol. 127: 2804-2811.
36. Hiratsuka S, Maru Y, Okada A, Seiki M, Noda T, Shibuya M. 2001. Involvement of Flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor-1) in pathological angiogenesis. Cancer

Res 61:1207–1213.

37. Hsueh AJ, Billig H, Tsafiriri A. 1994. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev.* 15:707-24.
38. Jia H, Jezequel S, Lohr M, Shaikh S, Davis D, Soker S, Selwood D, Zachary I. 2001. Peptides encoded by exon 6 of VEGF inhibit endothelial cell biological responses and angiogenesis induced by VEGF. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 283:164-173
39. Jolly PD, Tisdall DJ, Heath DA, Lun S, McNatty KP. 1994. Apoptosis in bovine granulosa cells in relation to steroid synthesis, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response to follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and follicular atresia. *Biol Reprod.* 41: 934-44.
40. Kaczmarek MM, Schams D, Ziecik AJ. 2005. Role of vascular endothelial growth factor in ovaries physiology- an overview. *Reproductive Biol.* Vol 5:2; 111-132.
41. Kaczmarek MM, Kowalczyk AE, Waclawik A, Ziecik AJ. 2007. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and its Receptors in

the Porcine Corpus Luteum During the Estrous Cycle and Early Pregnancy. *Mol Reprod and Development*. 74:730 – 739.

42. Kaczmarek MM, Kiewisz J, Schams D, Ziecik A. 2009. Expression of VEGF-receptor system in conceptus during peri-implantation period and endometrial and luteal expression of soluble VEGFR-1 in the pig. *Theriogenology*, 71: 1298-1302.
43. Kaufman PB, Cseke LJ, Podila GK, Tsai CJ. 2003. *Handbook of Molecular Methods in biology and Medicine*. Segunda Edición. CRC Press Londres. 580 Pág.
44. Kendall RL y Thomas KA. 1993. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90:10705-10709.
45. Kendall RL, Wang G, Thomas KA. 1996. Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, Flt-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun*. 226:324-328.
46. Knight PG y Glister C. 2001. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and



- follistatin in the ovary. *Reproduction*. 121:503-12.
47. Kulick LJ, Kot K, Wiltbank MC, Ginther OJ. 1999. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. *Theriogenology*. 52:913-21.
  48. Laemmli UK. 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680- 685.
  49. LeCouter J, Moritz DR, Li B, Phillips GL, Liang XH, Gerber HP, Hillan KJ, Ferrara N. 2003. Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science* 299:890 – 893.
  50. Lowry HO, Rosebrough NJ, Lewis Farr A, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal Biol Chem* 193: 265-275.
  51. Looper ML, Vizcarra JA, Wettemann RP, Malayer JR, Braden TD, Geisert RD, Morgan GL. 2003. Influence of estradiol, progesterone, and nutrition on concentrations of gonadotropins and GnRH receptors, and abundance of mRNA for GnRH receptors and gonadotropin subunits in pituitary glands of beef cows. *J Anim Sci*. 81:269-78.

52. Lockwood GM, Muttukrishna S, Groome NP, Matthews DR, Ledger WL. 1998. Mid-follicular phase pulses of inhibin B are absent in polycystic ovarian syndrome and are initiated by successful laparoscopic ovarian diathermy: a possible mechanism regulating emergence of the dominant follicle. *J Clin Endocrinol Metab.*83:1730-5.
53. Lucy MC, Savio JD, Badinga L, De La Sota R L, Thatchers WW. 1992. Factors That Affect Ovarian Follicular Dynamics in Cattle. *J. Anim. Sci.* 70:3615-3626.
54. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA. 2003. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J. Clin. Invest.* 111, 649 – 658.
55. Martínez DG. 1998. Desarrollo y estandarización de un inmunoensayo enzimático indirecto como método de diagnóstico para la brucellosis caprina utilizando proteínas de la

membrana de *Brucella melitensis*. Tesis Universidad Autónoma de México.

56. Matsumoto Y, Tanaka K, Hirata G, Hanada M, Matsuda S, Shuto T, Iwamoto Y. 2002. 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. of Immunology*. 168;5824-5831.
57. Mattioli M, Barboni B, Turriani M, Galeati G, Zannoni A, Castellani G, Berardinelli P. and Scapolo, P.A. 2001. Follicle activation involves vascular endothelial growth factor production and increased blood vessel extension. *Biol. Reprod.* 65:1014-1019.
58. McGee EA y Hsueh AJW. 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews*. 21:200-214.
59. Meissner M, Stein M, Urbich C, Reisinger K, Suske G, Staels B, Kaufmann R, Gille J. 2004. PPAR $\alpha$  activators inhibit Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 Expression by Repressing Sp1-Dependent DNA Binding and Transactivation. *Circ Res*. 94: 324-332.

60. Mihm M, Austin EJ, Good TEM, Ireland JLH, Knight PG, Roche JF, Ireland JJ. 2000. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. *Biol. Reprod.* 63: 811- 819.
61. McNatty KP, Heath DA, Lundy T, Fidler AE, Quirke L, O'Connell A, Smith P, Groome N, Tisdall DJ. 1999. Control of early ovarian follicular development. *Journal of Reproduction and Fertility supplement.* 54: 3-16.
62. Nowak DG, Woolard J, Mohamed AE, Konopatskaya O, Saleem MA, Churchill AJ, Ladomery MR, Harper SJ, Bates DO. 2008. Expression of pro-and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors. *J. Cell Sci.* 15 (121)3487-3495.
63. Otani N, Minami S, Yamoto M, Shikone T, Otan H, Nishiyama R. 1999. The vascularendothelial growth factor/fms-like tyrosine kinase system in human ovary during the menstrual cycle and early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 3845-51.
64. Park E.J, Chen H.H, Jane Winer J, Houck AK, Ferrara N.1994. Placenta Growth Factor.

- Potentialiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo and high affinity binding to flt-1 but not to flk-1/kdr. *The Journal of Biological chemistry*. 269(41): 25646-25654.
65. Plendl J. 2000. Angiogenesis and Vascular Regression in the Ovary. *Anat Histol Embryol*. 9:257-266. 35.
66. Podar K y Anderson K.C. 2005. Review in translational hematology-The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implications. *BLOOD*. VOL 105(4): 1383-1395.
67. Quirk MS, Cowan GR, Harman MR, Hu LC, Porter AD. 2004. Ovarian follicular growth and Atresia: the relationship between cell proliferation and survival. *J. Anim Sci*. 82 (E. Suppl): E40-E52.
68. Rathbone MJ, Kinder JE, Fike K, Kojima F, Clopton D, Ogle CR, Bunt CR. 2001. Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. *Adv Drug Deliv Rev* 50: 277-320.
69. Reuvekamp A, Velsing-Aarts V, Poulina IEJ, Capello JJ, Duits AJ. 1999. Selective deficit of

- angiogenic growth factors characterises pregnancies complicated by preeclampsia *British of Obstetrics and Gynaecology* 106; 1019–1022.
70. Reynolds LP y Redmer DA. 1998. Expression of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in the ovary. *J Anim Sci*; 76:1671-1681.
71. Rivera MG y Fortune EJ. 2003. Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins –4 and –5 bovine follicular fluid: Implications for ovarian follicular selection and dominance. *Endocrinol.* 144(7): 2977-2987.
72. Robertson DM, Stephenson T, Cahir N, Tsigos A, Pruyers E, Stanton PG, Groome N, Thirunavukarasu P. 2001. Development of an inhibin alpha subunit ELISA with broad specificity. *Mol Cell Endocrinol.* 30;180(1-2):79-86.
73. Robinson RS, Nicklin LT, Hammond AJ, Schams D, Hunter MG, Mann EG. 2007. Fibroblast Growth Factor 2 is More Dynamic than Vascular Endothelial Growth Factor A During the Follicle-Luteal Transition in the cow. *Biol of Reprod* 77:28-36.
74. Rosales AM. 1998. *Atresia Folicular*. Ed.

Javier López Moctezuma. Biología de la Reproducción.

75. Rosales AM y Guzmán A. 2008. Apoptosis en la atresia folicular y la regresión del cuerpo lúteo. Revisión. *Téc Pecuaria México*. 46(2):159-182.
76. Sela S, Itin S, Natanson-Yaron S, Greenfield C, Goldman- Wohl D, Yagel S, Keshet E. 2008. 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*. 102: 1566-1574.
77. Sharma RK. 2000. Follicular atresia in goat: A review. *Indian Journal of Animal Sciences*, 70:1035-1046.
78. Shimizu T, Jiang Jin-Yi, Lijima K, Miyabayashi K, Ogawa Y, Sasada H, Sato E. 2003. Induction of follicular development by direct single injection of vascular endothelial growth factor gene fragments into the ovary of miniature gilts. *Biology of reproduction*, 69: 1388-1393.
79. Shimizu T, Kawahara M, Abe Y, Yokoo M, Sasada H, Sato E. 2004. Follicular Microvasculature and Angiogenic Factors in the

Ovaries of Domestic Animals. Journal of Reproduction and development, Vol. 49, No. 3; 181-192.

80. Shimizu T, Beriska B, Schams D, Miyamoto A. 2007. Expression of Angiopoietin (ANTP)-1, ANTP-2 and their receptors in the Dominants Follicles during Preovulatory Period in GnRH-Treated Cow. Repr Dom Anim 42: 221- 224.
81. Skinner MK. 2005. Regulation of Primordial Follicle assembly and development. Human Reproduction Update. 11:5. 461-471.
82. Spicer LJ, Convey EM, Tucker HA, Echternkamp SE. 1986. Effects of intermittent injections of LHRH on specific binding of 125I-labeled gonadotropins to granulosa and theca, and concentrations of steroids in serum and ovarian follicles during postpartum anovulation in suckled beef cows. J Anim Sci. 62:1324-31.
83. Takashi H y Shibuya M. 2005. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. Clinical Science. 109: 227-241.
84. Taylor PD, Wilson H, Hillier SG, Wiegand SJ,



- Fraser HM. 2007. Effects of inhibition of vascular endothelial growth factor at time of selection on follicular angiogenesis, expansion, development and atresia in the marmoset. *Molecular Human Reproduction*. 13 (10) 729-736.
85. Tempel-Brami C y Neeman M. 2002. Non-invasive analysis of rat ovarian angiogenesis by MRI. *Mol Cell Endocrinol*. 187: 19-22.
86. Thomas CP, Andrews JI, Liu KZ. 2007. Intronic polyadenylation signal sequences and alternate splicing generate human soluble Flt1 variants and regulate the abundance of soluble Flt1 in the placenta. *The FASEB Journal*. 21: 3885-3895.
87. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 9:4350-4.
88. Tripathi R, Rath G, Ralhan R, Salhan S. 2009. Soluble and membranous vascular endothelial growth factor receptor-2 in pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Yonsei Med J*. 50 (5)656-666.

89. Turzillo AM, Clapper JA, Moss GE, Nett TM. 1998. Regulation of ovine GnRH receptor gene expression by progesterone and oestradiol. *J Reprod Fertil.* 113(2):251-6.
90. Ulger H, Karabulut AK, Pratten M. 2000. The growth promoting effects of bFGF, PD-ECGF and VEGF on cultured postimplantation rat embryos deprived of serum fractions. *J Anat.* 197; 207-219.
91. Valdez KE, Cuneo SP, Turzillo AM. 2005. Regulation of apoptosis in the atresia of dominant bovine follicles of the first follicular wave following ovulation. *Reproduction.* 130:71-81.
92. Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. 1992. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. *Circula- growth factor. Science.* 255:989 – 991.
93. Wada H, Satoh N, Kitaoka S, Ono K, Morimoto T, Kawamura T, Nakano T, Fujita M, Shimatsu A, Hasegawa. 2009. Soluble receptor-2 is increased in sera of subjects with metabolic syndrome in association with insulin resistance. *J.*

Artheroclerosis.

94. Waltenberger J, Claesson Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. 1994. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 269:26988–26995.
95. Willingham MC. 1999. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *J Histochem Cytochem.* 47(9):1101-10. Wiltbank MC, Diskin MG, Flores JA and Niswender GD. (1990). *Biol Reprod* 42:239-245.
96. Webb R, Campbell BK, Garverick HA, Gong JG, Gutierrez CG, Armstrong DG. 1999. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. *Reproduction in Domestic Ruminants IV. J. Reprod. Fertil. Suppl.* 54:33–48.
97. Webb R, Garnsworthy PC, Gong JG, Armstrong DG. 2004. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences<sup>1</sup>. *J. Anim. Sci.* 82(E. Suppl.):E63–E74.
98. Wulff C, Wiegand SJ, Saunders PTK, Scobie GA y Fraser HM. 2001. Angiogenesis during follicular development in the primate and its

- inhibition by treatment with truncated Flt-1-Fc (Vascular Endothelial Growth Factor TrapA40). *Endocrinology*, Vol.42; 3244-3254.
99. Yin-Shang NG, Krilleke D, Shima DT. 2005. VEGF function in vascular patogenesis. *Experimental Cell Research* 312: 527-537.
100. Zeng H, Dvorak HF, Mukhopadhyay D. 2001. Vascular permeability factor (VPF)/vascular endothelial growth factor (VEGF) peceptor-1 down-modulates VPF/VEGF receptor-2-mediated endothelial cell proliferation, but not migration, through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways. *J Biol Chem* 276: 2 6969–26979.
101. Zimmermann CR, Xiao E, Husami N, Sauer VM, Lobo R, Kitajewski J, Ferin M. 2001. Short-term administration of antivascular endothelial grown factor antibody in the late follicular phase delays follicular development in the rhesus monkey. *JCE and M.* 86(2): 768-772.
102. Zimmermann CR, Hartman T, Kavic S, Pauli AS, Bohlen BP, Sauer VM, Kitaewski J. 2003. Vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis is essential for

gonadotropin-dependent follicle development.  
The J. Clin. Invest. 12:659-669.