



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00086

Matrícula: 2183801936

Identificación de las isoformas de VEGF y sus receptores de membrana (VEGFR1 y VEGFR2) y solubles (sVEGFR1 y sVEGFR2) en folículos jerárquicos de gallina.

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 10:00 horas del día 16 del mes de diciembre del año 2020 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. FRANCISCO FIERRO FIERRO  
DR. ADRIAN GUZMAN SANCHEZ  
MTRA. ANA DELIA RODRIGUEZ CORTEZ  
DRA. LUCIA ELIANA RANGEL PORTA



Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: HEIDY ANA ROSA PEREZ ALAMILLA

HEIDY ANA ROSA PEREZ ALAMILLA  
ALUMNA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. FRANCISCO FIERRO FIERRO

VOCAL

DR. ADRIAN GUZMAN SANCHEZ

VOCAL

MTRA. ANA DELIA RODRIGUEZ CORTEZ

SECRETARIA

DRA. LUCIA ELIANA RANGEL PORTA

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**UNIDAD IZTAPALAPA**  
**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**



**Maestría en Biología de la Reproducción Animal**

IDENTIFICACION DE LAS ISOFORMAS DE VEGF Y SUS RECEPTORES DE  
MEMBRANA (VEGFR1 y VEGFR2) Y SOLUBLES (sVEGFR1 y sVEGFR2) EN  
FOLÍCULOS JERÁRQUICOS DE GALLINAS

## **T E S I S**

Para obtener el grado de  
Maestra en Biología de la Reproducción Animal

### **PRESENTA**

MVZ. Heidi Ana Rosa Pérez Alamilla

### **Co- Directores de Tesis:**

Dra. Ana María Rosales Torres UAM- X

Dr. Carlos G. Gutiérrez Aguilar FMVZ, UNAM

### **Asesor:**

Dr. Francisco Fierro Fierro

## COMITÉ TUTORAL

1. Co-Director. Dra. Ana María Rosales Torres. Departamento de Producción Agrícola y Animal. Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco.  
[anamexico@gmail.com](mailto:anamexico@gmail.com)
2. Co-Director Dr. Carlos Guillermo Gutiérrez Aguilar. Departamento de Reproducción. Facultad de medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.  
[ggcarlos@unam.mx](mailto:ggcarlos@unam.mx)
3. Asesor Dr. Francisco Fierro Fierro. Depto. de Biotecnología UAM-I  
[degfff@yahoo.com](mailto:degfff@yahoo.com)

## MIEMBROS DEL JURADO

1. **Presidente del jurado y asesor de tesis:** Dr. Francisco Fierro Fierro.  
Depto. de Biotecnología UAM-I [degfff@yahoo.com](mailto:degfff@yahoo.com)
2. **Secretaria del jurado:** Dra. Lucía Eliana Rangel Porta. Departamento de Reproducción Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM  
[eliana@unam.mx](mailto:eliana@unam.mx)
3. **Vocal:** Dr. Adrián Guzmán Sánchez: Departamento de Producción Agrícola y Animal A UAM-X. [aguzman051181@gmail.com](mailto:aguzman051181@gmail.com)
4. **Vocal:** Mtra. Ana Delia Rodríguez Cortez. Departamento de Reproducción Facultad de Medicina Veterinaria Zootecnia, UNAM  
[ana\\_delia\\_rc@comunidad.unam.com](mailto:ana_delia_rc@comunidad.unam.com)

## Agradecimientos institucionales

La tesis "Identificación de las isoformas de VEGF y sus receptores de membrana (VEGFR1 y VEGFR2) y solubles (sVEGFR1 y sVEGFR2) en folículos jerárquicos de gallinas" se realizó en el Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción del Departamento de Producción Agrícola y Animal de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, bajo la tutoría de la Dra. Ana María Rosales Torres. El programa de Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana, pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNCP) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), registro 003797 en el nivel consolidado. Para la realización de los estudios de maestría la alumna Heidy Ana Rosa Pérez Alamilla, contó con el apoyo de beca CONACyT mediante el número de registro CVU 937135, durante el periodo 2018-2020. También agradecemos al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) y La Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) PAPIIT-DGAPA IN229520 por el apoyo.

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: "Identificación de las isoformas de VEGF y sus receptores de membrana (VEGFR1 y VEGFR2) y solubles (sVEGFR1 y sVEGFR2) en folículos jerárquicos de gallinas" que presento:

**MVZ. Heidy Ana Rosa Pérez Alamilla**, el día 16 de diciembre de 2020

**Jurado:**

**Presidente:** Dr. Francisco Fierro Fierro



---

**Secretaria:** Dra. Lucía Eliana Rangel Porta



---

**Vocal 1:** Dr. Adrián Guzmán Sánchez



---

**Vocal 2:** Mtra. Ana Delia Rodríguez Cortez



---

## Dedicatoria

A mis padres Ana María Alamilla Basurto y Martín Pérez Vázquez por el amor y apoyo incondicional, por darme los mejores consejos, por haberme forjado como la persona que soy actualmente; todos mis logros se los debo a ustedes incluyendo este. Gracias por ser los principales promotores de mis sueños, por creer en mí y en mis expectativas, gracias a mi madre por acompañarme cada largo día de estudio. Gracias a mi padre por siempre desear lo mejor para mí en la vida. Me formaron con reglas y con algunas libertades, pero al final siempre me motivaron para alcanzar mis sueños. Gracias por sus consejos, por la confianza, pero sobre todo gracias por estar siempre conmigo, los amo mucho.

A mis hermanos y sobrinos por sus palabras, su compañía, por su alegría, por su amor y por motivarme a ser cada día mejor persona, por estar ahí cuando mas los necesito con un consejo y lindas palabras de aliento, los amo.

A Luis Cázares por estar en todo momento, por el apoyo en este trabajo y en la vida. Gracias por la motivación, por la ayuda que me brindas. Tu ayuda ha sido fundamental en cada momento y gracias por impulsarme a ser mejor persona te amo.

Gracias a Dios por todos los buenos momentos a lado de gente maravillosa como mi familia y amigos.

## Agradecimiento

A mi directora de tesis la **Dra. Ana María Rosales Torres**, por la dedicación y apoyo que ha brindado a este trabajo, por el respeto a mis sugerencias e ideas, por la dirección y entusiasmo a este proyecto. Gracias por la confianza que me ha proporcionado en todo momento.

A mi director de tesis el **Dr. Carlos G. Gutiérrez Aguilar** por los conocimientos transmitidos, así como sus revisiones y comentarios que ayudaron a mejorar.

A mi asesor el **Dr. Francisco Fierro Fierro** por el tiempo, dedicación, por compartir sus conocimientos y por el gran aporte al proyecto.

Al **Dr. Adrián Guzmán Sánchez** por su gran ayuda en la realización de las técnicas en el laboratorio. Por transmitir sus conocimientos teóricos y prácticos, por sus consejos y sugerencias.

Al **Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales** por su orientación y atención a mis consultas sobre metodología y la ayuda para realizar las técnicas de clonación y secuenciación.

Al **MVZ. Luis Cázares Rodríguez** por siempre estar y por la solidaridad a este proyecto, pero sobre todo por el apoyo moral y la confianza.

A la **Dra. Cyndi Hernández** por el apoyo en el laboratorio para la realización de las técnicas.



## Resumen

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es un factor importante durante el desarrollo folicular de las diferentes especies, debido a sus efectos angiogénicos, permite a las células del folículo y al ovocito recibir nutrientes, oxígeno, hormonas y facilita la liberación de esteroides hacia el torrente sanguíneo. Adicionalmente este factor de crecimiento tiene efectos citoprotectores y proliferativos en células endoteliales y no endoteliales. El VEGF está codificado por un gen compuesto por 8 exones separados por 7 intrones que como resultado de corte y empalme en los exones 6, 7 y 8 del pre ARNm se forman distintas isoformas. Los efectos biológicos de VEGF son mediados principalmente por la unión a dos receptores tipo tirosina quinasa, el VEGFR1 o Flt-1 y VEGFR2 o Flk-1. Además, por proceso de corte y empalme del ARNm de los receptores de membrana, se sintetizan dos receptores solubles denominados sVEGFR1 y sVEGFR2 los cuales ejercen un efecto anti angiogénico. El objetivo del presente estudio fue identificar la presencia de isoformas de VEGF en células de la granulosa y teca de folículos jerárquicos de gallina, así como demostrar la presencia de los receptores de membrana VEGFR1 y VEGFR2 y sus respectivas formas solubles sVEGFR1 y sVEGFR2, además de mostrar las secuencias que confirman cada uno de estos componentes del sistema VEGF. Se realizaron PCR punto final de cada muestra, para ello, se extrajo ARNm en un pool de células de la granulosa y de la teca de folículos F1 y F2 de gallinas Legohrn, expuestas a un fotoperiodo de 14 h luz y 10 h oscuridad. Se diseñaron cebadores específicos para los cuatro receptores y un par de primer ubicados en el exón 4 y 8 para observar la expresión de todas las isoformas de VEGF que se encuentren en estas células. Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 2% para identificar las bandas correspondientes a las isoformas y receptores. En el gel de agarosa de isoformas de VEGF se observaron y cortaron cinco bandas, con un tamaño aproximado de 120, 200, 270, 350 y 450 pb, de acuerdo al marcador de peso molecular que se usó; en el caso de los receptores se cortaron las bandas únicas que correspondían a los amplicones de cada gen, se obtuvieron bandas de 102, 103, 129 y 79 pb. Estas bandas se sometieron a un proceso de purificación y los productos, se sometieron a clonación con un vector pUCm-T resistente a ampicilina y su posterior purificación y secuenciación. El resultado de las secuenciaciones muestra la presencia de cuatro isoformas del ligando, que corresponden a VEGF 122, VEGF 146, VEGF 166, VEGF 190 y una quinta banda que no se tiene la secuenciación, pero se sugiere corresponde a VEGF 207, tanto en células de la granulosa como en células de la teca. De la misma manera se compararon las secuencias en GenBak con las obtenidas en este experimento y se comprobó la presencia de receptores de membrana, VEGFR1 y VEGFR2 y de sus formas solubles sVEGFR1 y sVEGFR2 en células de la granulosa y teca de folículos 1 y 2 jerárquicos de gallina, así como en el hígado que fue usado como control.

## Abstract

The vascular endothelial growth factor (VEGF) is necessary for follicular development in several species, because its angiogenic effect, which allow the supply of nutrients, oxygen and hormones to follicular cells and oocyte of, as well release of sexual steroids into the blood vessels. Moreover, the VEGF has proliferative and cytoprotective effects on follicular cells. The VEGF gene, has 8 exons and 7 introns and result of alternative splicing in the exons 6, 7 and 8 of the immature mRNA several isoforms are synthesized. VEGF biological effects are mainly mediated by two membrane receptor tyrosine-like kinase, namely VEGFR1 or Flt-1 and VEGFR2 or Flk-1. During maturation of immature mRNA of VEGF membrane receptors, two soluble isoforms, one for each receptor denoted sVEGFR1 and s VEGFR2, are formed, which have antiangiogenic effects. The objective of present study was identifying the mRNA expression of VEGF isoforms in granulosa and theca cells of hen hierarchical follicles and show if they express the membrane and soluble VEGF receptors. Likewise, to show the sequence of all the members of VEGF systems expressed. Total mRNA was extracted in a pool of granulosa and theca cells from F1 and F2 hierarchical follicles of Leghorn hens, exposed to a photoperiod of 14 h light and 10 h dark. Endpoint PCR was performed on each sample using specific primers for the four receptors and a pair of primers located in exon 4 and 8 to amplifying all the VEGF isoforms. The PCR products were run on 2% agarose gel to identify the bands corresponding to the isoforms and receptors. In the VEGF gel, five bands were observed and cut, with an approximate size of 120, 200, 270, 350 and 450 bp. Regarding to receptors, one unique band corresponding to the amplicons of each gene were observed. After purification and cloning of these bands, in both granulosa and theca cells the presence of four isoforms of VEGF were identified, corresponding to VEGF122, VEGF146, VEGF166 and VEGF190. The faith band that we observed but not sequencing is suggested to correspond to VEGF 207. Similarly, the membrane receptors, VEGFR1 and VEGFR2 and their soluble isoforms sVEGFR1 and sVEGFR2 in granulosa and theca cells of hierarchical follicle F1 and F2 were verified.

## Índice general

1. Introducción .....	1
2. Antecedentes .....	3
2.1. Factor del crecimiento del endotelio vascular (VEGF).....	3
2.2. Efectos de VEGF.....	5
2.2.1. Proliferación .....	6
2.2.2. Supervivencia .....	7
2.2.3. Permeabilidad vascular.....	8
2.3. Isoformas .....	9
2.3.1. Estructura y función.....	9
2.3.2. Proceso de corte y empalme .....	11
2.3.2.1. Corte y empalme alternativo .....	12
2.4. Receptores de membrana de VEGF.....	13
2.5. Receptores solubles de VEGF.....	15
2.6. Angiogénesis folicular .....	16
2.7. Evidencias de la participación del sistema VEGF en el ovario de diferentes especies .....	18
2.7.1. Evidencias de la importancia de las isoformas de VEGF.....	19
2.7.2. Evidencias de la importancia de los receptores de VEGF.....	19
2.8. Sistema VEGF en gallinas .....	21
2.9. Desarrollo folicular en aves .....	21
3. Objetivo general .....	24
4. Objetivos específicos .....	24
5. Hipótesis .....	24
6. Planteamiento del problema .....	24
7. Material y Método.....	25
7.1. Lugar de realización .....	25
7.2. Obtención de folículos, células de la granulosa y células de la teca.....	26

7.3.	Extracción de ARN total .....	26
7.4.	PCR punto final.....	27
7.5.	Purificación de fragmentos de PCR punto final .....	29
7.6.	Clonación y secuenciación .....	30
8.	Resultados .....	31
8.1.	Productos de PCR punto final .....	31
8.2.	Secuenciación .....	33
9.	Discusión .....	36
10.	Conclusión .....	44
11.	Referencias .....	46

## Índice de figuras

Figura 1. Gel agarosa al 2%, productos de PCR punto final de células foliculares.....	32
Figura 2. Gel de agarosa al 2%, productos de PCR punto final de células de hígado de gallina .....	32
Figura 3. Gel de agarosa al 2%, purificado de células foliculares .....	33
Figura 4. Resultados de la secuenciación de las isoformas de VEGF.....	34
Figura 5. Resultados de la secuenciación de VEGFR2.....	35
Figura 6. Resultados de la secuenciación de sVEGFR1.....	35

## **Índice de imágenes**

Imagen 1. Estructura del gen VEGF y variaciones de empalme identificadas en VEGF-A.....	11
Imagen 2. Corte y empalme alternativo .....	13
Imagen 3. Señalización intracelular de VEGF.....	16

## **Índice de tablas**

Tabla 1. Primers usados en PCR punto final.....28

Tabla 2. Secuenciación de genes encontrados en células foliculares de gallina.....36

## 1. Introducción

Una adecuada red vascular durante el desarrollo folicular permite a las células del folículo y al ovocito recibir nutrientes, oxígeno, hormonas y facilitar la liberación de esteroides (Ferrara *et al.*, 2003). En contraste la inhibición de la angiogénesis puede llevar a la muerte celular, característica en la atresia folicular (Robinson *et al.*, 2009).

Una molécula determinante en la formación de vasos sanguíneos durante el desarrollo folicular es el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF por sus siglas en inglés). El VEGF es considerado como el principal regulador de la formación de nuevos vasos sanguíneos e induce la angiogénesis requerida para el desarrollo folicular (Rosales *et al.*, 2010). El VEGF como su nombre lo dice, se ha estudiado principalmente en células del endotelio vascular, aunque tiene distintos efectos en otros tipos celulares (miocitos, macrófagos, neuronas, células epiteliales del riñón y células cancerosas)(Sánchez, 2013; De Almeida, 2015; Ortuzar, 2012; Rissanen *et al.*, 2002). En un principio solo se conocían las isoformas angiogénicas en células endoteliales, posteriormente se le han atribuido efectos como la sobrevivencia y proliferación en diferentes tejidos, estos efectos mediados principalmente por la unión a sus receptores (Greenaway *et al.*, 2004; Irusta *et al.*, 2010; Xin *et al.*, 2016). Sin embargo, en células de la granulosa de mamíferos, se ha observado que este factor también induce la proliferación (Irusta *et al.*, 2010) y actúa como citoprotector (Greenaway *et al.*, 2004). La expresión elevada de VEGF y sus receptores se asocia con folículos sanos en comparación con folículos atrésicos (Rosales *et al.*, 2010; Ortega *et al.*, 2016)

El VEGF está codificado por un gen organizado en 8 exones separados por 7 intrones, como resultado del corte y empalme en el exón 6,7 y 8 del pre ARNm se forman distintas isoformas, cuyas proteínas pueden contener en el caso de humanos 121, 145, 148, 165, 183, 189 y 206 aminoácidos, esta diferencia en el número de aminoácidos, les da distinta actividad biológica (Ferrara *et al.*, 2003). Estas isoformas se clasifican en dos familias: proangiogénicas y anti angiogénicas. Cuando el sitio de corte y empalmen en el axón 8 ocurre en la porción proximal (8a), estas isoformas son conocidas como pro angiogénicas y se denominan VEGFxxx, siendo xxx el número de aminoácidos en la proteína. Por otro



lado, si el corte y empalme del exón 8 ocurre en la parte distal (8b), las proteínas formadas son conocidas como anti angiogénicas (VEGF<sub>xxx</sub>b) (Ferrara, 2004)

Los efectos biológicos de VEGF son mediados principalmente por la unión a dos receptores tipo tirosina quinasa; el VEGFR1 o Flt-1 y el VEGFR2 o FLk-1. El VEGFR2 promueve la proliferación, sobrevivencia, permeabilidad vascular y migración celular, mientras que VEGFR1 estimula solamente la permeabilidad y migración celular (Gille *et al.*, 2001; Shibuya, 2001, 2006). Adicionalmente por proceso de corte y empalme del ARNm de los receptores de membrana, se sintetizan dos receptores solubles sVEGFR1 y sVEGFR2, los cuales pierden los dominios trans membranal e intra citoplasmático, con lo cual solo conservan el dominio de unión al ligando y por lo tanto estos receptores mantienen la afinidad por VEGF pero no son capaces de transmitir los efectos biológicos de VEGF (Macias *et al.*, 2011).

La relación de las isoformas de VEGF y sus receptores ha sido investigada en mamíferos, cada una de las isoformas de VEGF presenta características específicas que son proporcionadas por los exones con los que cuentan en el caso de VEGF<sub>120</sub> que carece del exón 6 es incapaz de unirse a heparina por lo que es más difusible en el medio, por su parte la isoforma VEGF<sub>164</sub> cuenta con el exón 7 el cual le da la propiedad de unirse a heparina, por lo que la isoforma 188 y 205 que cuentan con los exones 6 y 7 tienen una alta afinidad por la heparina lo que las hace isoformas menos soluble, quedando secuestrados en la matriz extracelular (Ferrara, 2004; Greenaway *et al.*, 2004; Irusta *et al.*, 2010; Shimizu *et al.*, 2007). Las isoformas más abundantes son VEGF<sub>120</sub> y VEGF<sub>164</sub> y se ha visto una gran relación de estas isoformas durante la angiogénesis folicular (Shimizu *et al.*, 2007). La isoforma VEGF<sub>144</sub> se ha visto relacionada con la presencia de carcinomas en el aparato reproductor femenino (Elias *et al.*, 2008), en aves es escasa la información respecto al sistema VEGF y su regulación. La regulación de VEGF en mamíferos esta mediada por la presencia de isoformas angiogénicas y anti angiogénicas, así como la presencia de los receptores solubles que juegan un papel importa durante los procesos de angiogénesis. A la fecha hay evidencias de la presencia de VEGF total y sus receptores de membrana en el desarrollo folicular de las gallinas lo cual está asociado con la salud del folículo (Kim

*et al.*, 2016). Además en tejidos como el hígado, riñón y corazón de embriones de gallinas y codornices se han reportado al menos 4 isoformas, VEGF122, VEGF146, VEGF166 y VEGF190, las cuales son equivalentes a las encontradas en mamíferos, con un aminoácido más (Flamme, Breier, & Risau, 1995). Aparentemente en aves, no existen las isoformas anti angiogénicas VEGFxxx<sub>b</sub>, lo cual nos lleva a pensar en una forma distinta de regulación de la acción de los ligandos en esta especie, es probable que en este caso la regulación ocurra por la acción de los receptores de membrana/solubles. Las gallinas por ser una especie con ovulación diaria y donde se requiere una dinámica acelerada de crecimiento y desarrollo folicular, lo cual demanda de procesos de irrigación, proliferación y protección celular, resulta interesante para explorar la presencia de los componentes del sistema VEGF (ligandos y receptores). Por lo anterior en este trabajo nos propusimos indagar cuáles isoformas de VEGF se expresan en células de la granulosa y teca de folículos jerárquicos de gallinas e identificar la presencia de los receptores de membrana VEGFR1, VEGFR2 y sus formas solubles, sVEGFR1 y sVEGFR2.

## 2. Antecedentes

### 2.1. Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) también conocido como factor de permeabilidad vascular (VPF), se describió originalmente como un mitógeno específico de células endoteliales. El VEGF es una familia de polipéptidos secretados con una estructura de nudo de cistina (dímero de dos cisteínas unidas por un enlace disulfuro) de unión al receptor altamente conservada similar a la de los factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF) (Goel *et al.*, 2013). Los miembros de la familia VEGF incluyen a las proteínas homodiméricas: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D (Ferrara, 2002) y el VEGF-E viral codificado por las cepas D1701, NZ2 y NZ7 del parapoxvirus *Orf* (que causa dermatitis pustulosa) (Savory *et al.*, 2000). Estos miembros de VEGF realizan su función en las células diana a través de tres receptores con actividad tirosina cinasa: VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3, este último tiene capacidad para unirse a VEGF-C y VEGF-D, todos localizados en células endoteliales y en otros tipos celulares (Veikkola *et al.*, 2000). VEGF-A es el miembro más estudiado y el que controla principalmente el

proceso de angiogénesis por lo cual de aquí en adelante nos referiremos a él como VEGF solamente. El VEGF es una glucoproteína homodimérica de unos 45 kDa, el gen que codifica para VEGF se ubica en el cromosoma 6p21.3 en humanos y el cromosoma 3 en gallinas.

El VEGF está implicado en la vasculogénesis (formación de vasos en un tejido vascular) y en la angiogénesis (crecimiento de vasos sanguíneos provenientes de vasos preexistentes) (Ferrara *et al.*, 2003). El VEGF estimula la supervivencia de las células endoteliales, su proliferación y migración, iniciando la formación de nuevos capilares (Xin *et al.*, 2016). El VEGF se ha encontrado en todas las especies de vertebrados examinados hasta ahora y están altamente conservados entre especies. La alineación de los dominios de homología VEGF que conforman los residuos de cisteína demuestran alto grado de conservación regional desde mamíferos hasta aves como especie *Gallus gallus* (Holmes *et al.*, 2005). El VEGF es producido por muchos tipos de células, incluidas las células tumorales, macrófagos, plaquetas, queratinocitos, y células mesangiales renales (Baijun *et al.*, 2004; De Almeida, 2015; Reynoso, 2010; Thomas *et al.*, 2000). Las actividades de VEGF no se limitan al sistema vascular; el VEGF desempeña un papel en las funciones fisiológicas normales que comienza en el desarrollo embrionario para proporcionar oxígeno y nutrientes a los órganos durante su crecimiento (Ferrara, 2002), también es fundamental en la formación de huesos y la hematopoyesis (Ferrara *et al.*, 2003). Durante la vida adulta de los individuos la angiogénesis fisiológica ocurre únicamente en el ovario de las hembras durante el desarrollo folicular, el desarrollo del cuerpo lúteo, en la placenta durante el embarazo y durante la cicatrización de heridas (Carmeliet, 2005; Dvorak, 2005).

El gen de VEGF está compuesto por ocho exones y siete intrones que durante el procesamiento el ARNm inmaduro del VEGF se producen hasta 6 isoformas distintas que difieren en número de aminoácidos y por ende en su peso molecular. Estas isoformas se conocen como VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189 y VEGF206 en humano (Nowak *et al.*, 2008). La isoforma VEGF165 es la isoforma más conocida y estudiada, producida por la mayoría de tipos celulares, ésta es una proteína que aunque cuenta con un fragmento que se une a la matriz extracelular, es difusible en el medio

(ECM) (Gerber *et al.*, 1999). Por el contrario, VEGF 121 es una isoforma altamente difusible que no se une a heparina (Houck *et al.*, 1991), mientras VEGF 189 y 206 se unen con más fuerza a la heparina y por lo tanto se encuentran completamente secuestradas en la ECM. La isoforma VEGF145 se ha encontrado en carcinomas del sistema reproductor femenino (Elias *et al.*, 2008). Las diferentes isoformas de VEGF regulan la angiogénesis y la permeabilidad vascular mediante la activación de dos receptores principalmente; VEGFR- 1 y VEGFR- 2, los cuales poseen siete dominios similares a las inmunoglobulinas que funcionan como dominios extracelulares encargados del reconocimiento del VEGF, una región transmembrana y una secuencia tirosina quinasa que se interrumpe por una quinasa insertada en el dominio intracelular (Ferrara *et al.*, 2003 ; Shibuya, 2001). Adicionalmente por proceso de corte y empalme alternativo del ARNm inmaduro de los receptores de membrana, se sintetizan dos receptores solubles, sVEGFR1 y sVEGFR2, que carecen de la región transmembranal e intracelular, pero conservan el dominio de enlace de ligando. Estos receptores solubles mantienen la afinidad por VEGF, pero no son capaces de transmitir los efectos biológicos de VEGF (Robinson *et al.*, 2001). Nosotros hemos llamado sistema VEGF, a las isoformas, a los receptores de membrana y a los receptores solubles, por lo cual en adelante así será referido.

## 2.2. Efectos de VEGF

La respuesta a VEGF en células endoteliales tiene un papel fundamental en el proceso de angiogénesis, entre los muchos factores que favorecen este proceso VEGF se ha propuesto como uno de los más potentes (Ferrara, 2004). Este proceso incluye la migración y proliferación de células endoteliales, la formación y organización de grupos celulares que eventualmente se unirán, para madurar y formar vasos sanguíneos estables. La distribución de oxígeno y nutrientes es fundamental para la sobrevivencia de las células, por esta razón es importante que se creen una fuente propia de irrigación mediante la formación de nuevos vasos sanguíneos que les permitan evadir la muerte (Ferrara *et al.*, 2003).

La expresión de VEGF en células endoteliales está mediada por la cantidad de oxígeno disponible en estas, debido a que si existen condiciones de baja presión esta estimulará

a VEGF, de esta manera la hipoxia se considera el factor detonante de la angiogénesis. La baja presión de oxígeno estimulara el incremento de HIF 1 el cual actúa a nivel del núcleo provocando la transcripción de genes en los que destaca VEGF (Alam *et al.*, 2009). La unión de este factor con su receptor inducirá respuestas como la supervivencia, migración y proliferación de las células endoteliales a través de segundos mensajeros (Gille *et al.*, 2001). En modelos preclínicos se ha demostrado que VEGF induce la supervivencia en vasos ya existentes y estos efectos son mediados principalmente por la interacción con su receptor VEGFR-2. El VEGF ha demostrado facilitar la sobrevivencia de vasos ya existentes debido a que participa en el desarrollo de anomalías vasculares como tortuosidad e hiperpermeabilidad en los vasos sanguíneos (Tahergorabi *et al.*, 2012).

### 2.2.1. Proliferación

Aunque las células endoteliales son el blanco principal de VEGF en distintos estudios se ha demostrado los efectos mitogénicos en células no endoteliales. Entre los factores reguladores de la angiogénesis se encuentra principalmente la hipoxia, la falta de oxígeno en el tejido estimula la síntesis de HIF-1 $\alpha$  y a su vez activa moléculas angiogénicas como VEGF. Estos factores promueven la proliferación endotelial y dirigen el crecimiento vascular (Rosales *et al.*, 2011). La proliferación celular esta mediada por una serie de serina tirosina quinasas denominadas quinasas dependientes de ciclinas (CDK). Estas moléculas se activan en intervalos específicos del ciclo celular mientras actúan como punto de control de las células que son clasificadas para someterse a división (Mirza *et al.*, 2019) en distintos estudios se ha demostrado que la inhibición de la vía de las quinasas se ha utilizado como terapia de cáncer (Her *et al.*, 2018; Suh *et al.*, 2010). En estudios en distintas especies como bovinos (Berisha *et al.*, 2000) humanos (Tapia *et al.*, 2006) y ratones (Marconi *et al.*, 2007) se ha demostrado la expresión de ARNm de VEGF y está altamente relacionado con la proliferación de vasos sanguíneos en el ovario (Ferrara *et al.*, 2003). Además, el desarrollo folicular y el desarrollo del cuerpo lúteo depende de la proliferación de nuevos capilares (Rosales *et al.*, 2011). La administración de inhibidores de VEGF en especies como roedores y primates suprime la angiogénesis lútea y retrasa el desarrollo folicular (Ferrara *et al.*, 1989). La

administración de antagonistas específicos de VEGF en el desarrollo folicular muestran que la inhibición de VEGF resulta en una disminución de la proliferación de células endoteliales y de células de la granulosa de los folículos en monos titi (Fraser *et al.*, 2002).

Rissanen y colaboradores inyectaron adenovirus que codificaba a VEGF 164 de ratón en conejos después de la inducción de la isquemia, 30 días después de la inserción del gen se observó un efecto positivo en la densidad capilar del muslo de los conejos tratados con este gen en comparación con los tratados con soluciones salinas (2002).

### 2.2.2. Supervivencia

En las células endoteliales la interacción entre señales de cito protección y apoptosis contribuyen a la regulación de la angiogénesis tanto fisiológica como patológica. La vía PI3K/Akt está implicada en el crecimiento, la supervivencia y el tono vascular de las células endoteliales regulada por VEGF. Esta vía juega un papel importante en la señalización del proceso de apoptosis. La vía Akt1 inhibe la apoptosis a través de Bad, caspasa 9, factores de transcripción, cada uno de estos representa una función crítica en el control de la muerte celular (Liao *et al.*, 2010). En un estudio en ratones se demostró que la pérdida de Akt 1 afectó la señalización de VEGF necesarias para la angiogénesis. Se sabe que Akt ejerce función sobre la regulación de la proteína p38 MAPK (p38 proteína quinasa activada por mitógeno) la cual es importante en la regulación de la apoptosis de células endoteliales. Akt desempeña una función inhibitoria sobre p38 fosforilando e inhibe a MEKK3 (MAPK/ERK quinasa quinasa 3; activador de la enzima p38) (Farzaneh *et al.*, 2020).

El óxido nítrico (NO) es otro regulador importante de la apoptosis, existen muchas evidencias de que NO en condiciones fisiológicas normales actúa como citoprotector, como mediador de señales relacionadas con la apoptosis. El NO actúa inhibiendo a la caspasa 3 mediante s-nitrosilación de su residuo de cisteína. De acuerdo a esto el efecto producido por VEGF a la vía PI3 quinasa/akt/eNOS nos permite decir que actúa como citoprotector en el mantenimiento de las estructuras vasculares (Lee *et al.*, 2014).

El VEGF participa en la supervivencia de las células endoteliales, previniendo la apoptosis lo cual ocurre porque este factor promueve la expresión de proteínas anti

apoptóticas como Bcl-2 (Dejana *et al.*, 2008). Uno de los mecanismos por el cual VEGF promueve la formación de vasos sanguíneos es mantener la integridad de las células endoteliales y la activación de señales de supervivencia. VEGF además de inducir la expresión Bcl-2, promueve otras proteínas anti apoptóticas como A1, XIAP y supervivina en células endoteliales y todas ellas inhiben la activación de las caspasas, protagonistas de la muerte celular (Dejana *et al.*, 2008). En un estudio realizado en células cancerosas de ratón y humano, se demostró el efecto regulador de expresión VEGF en la expresión de Bcl-2 y sus efectos en la reducción de apoptosis de las células tumorales, mientras que el uso de un inhibidor de VEGF indujo a las células hacia la apoptosis (Pidgeon *et al.*, 2001).

El VEGF estimula la quimiotaxis en las células no vasculares tales como células microgliales. En un estudio realizado en células microgliales de ratón en cultivo, se demostró que VEGF tuvo un efecto en la proliferación y migración provocado por la activación del receptor VEGFR1 por medio de la vía Akt (Forstreuter *et al.*, 2002). También se han observado efectos similares mediados por VEGFR1 en osteoblastos (Henriksen *et al.*, 2003). Además, VEGF es capaz de promover neuroprotección en desórdenes isquémicos (Foxton *et al.*, 2013; Froger *et al.*, 2020).

### 2.2.3. Permeabilidad vascular

A VEGF, se le conoce también como factor de permeabilidad vascular, porque esta fue una de las primeras acciones que se le atribuyeron, esta función la participación de VEGF estimula la permeabilidad vascular con mecanismos de fosforilación de la E-cadherina y  $\beta$ -catenina. Las uniones intercelulares, permiten la interacción directa con las células endotelial vascular, por medio de la unión de complejos de proteínas (Dejana *et al.*, 2008). Este proceso permite crear una barrera que es regulada por la estabilidad de adherencias celulares como la E-cadherina y  $\beta$ -catenina, p120-catenina y la  $\alpha$ -catenina las cuales se encuentran implicadas en el control de la permeabilidad vascular (Jain, 2005). Esto permite la salida de proteínas plasmáticas y la formación de la matriz extracelular favorable para la migración de células endoteliales. Además, activadores e inhibidores del plasminógeno y colagenasa intersticial promueven la degradación de proteínas que genera nuevos componentes, los cuales son necesarios para la matriz

extracelular y permitir la angiogénesis. El VEGF también estimula la permeabilidad vascular promoviendo la fosforilación de la tirosinas de  $\beta$ -catenina y E cadherina, sustancias que se encuentran implicadas en la regulación de la permeabilidad vascular (Weis *et al.*, 2005). La isoforma VEGF121 es la principal responsable del aumento de la permeabilidad vascular (Dejana *et al.*, 2008).

La permeabilidad vascular está mediada por dos vías transcelular y paracelular, esto significa que los solutos pasan a través de las células o entre las células respectivamente. El paso por medio de la vía transcelular requiere de la producción de poros que controlan la permeabilidad de agua y solutos (Ioannidou *et al.*, 2006) o por medio de vesículas que se unen y atraviesan a las células endoteliales. La vía paracelular está regulada por la apertura y el cierre de las uniones entre las células (Dejana, 2004).

La permeabilidad vascular está mediada por el cierre y la apertura de uniones comunicantes entre dos células vasculares, estas células están compuestas por cadherina endotelial vascular. El VEGF estimula la permeabilidad vascular en los vasos sanguíneos promoviendo la filtración de plasma con mecanismos de fosforilación de las tirosinas de E- cadherina y  $\beta$ - catenina que participa en la formación de uniones adherentes (Weis *et al.*, 2005). Las uniones intercelulares permiten la interacción con células endoteliales por medio de la unión de complejos de proteínas que participan en la creación de una barrera que controla la permeabilidad vascular. El VEGF también promueve la pérdida de esta barrera interactuando con los receptores para factores de crecimiento angiogénico como las integrinas y las cadherinas promoviendo la permeabilidad de los vasos sanguíneos (Nelson, 2008). Los cambios en la permeabilidad vascular mediados VEGF promueven el aumento del acceso de nutrientes y oxígeno a los tejidos, así como el paso de leucocitos en caso de inflamación y fibrinógeno para la recuperación de tejidos (Dejana *et al.*, 2008).

## 2.3. Isoformas de VEGF

### 2.3.1. Estructura y función

Como se mencionó previamente como resultado del corte y empalme alternativo del pre ARNm de un único gen de VEGF se forman distintas isoformas (imagen 1). Todas las isoformas de VEGF poseen los exones 1 a 5 y 8, mientras que la presencia o ausencia



de los exones 6 y 7, determina cada una de las variantes, así como, las características de cada una de las isoformas (Ribeiro *et al.*, 2007). Los exones 3 y 4 contienen los sitios de unión para los receptores VEGFR1 y VEGFR2, respectivamente (Rohan *et al.* 2000). La mayoría de las isoformas de VEGF tienen un dominio de unión a la heparina que interactúa con células que asocian proteoglicanos tipo heparán sulfato (HSPGs) codificado por el exón 7 (Ferrara, 2004).

En humanos, las proteínas que resultan de las isoformas de VEGF contienen 121, 145, 148, 165, 183, 189 y 206 aminoácidos respectivamente. Los homólogos de estas proteínas en animales contienen un aminoácido menos (Ferrara *et al.*, 2003) y en las aves contienen un aminoácido más que en las isoformas de humano (Flamme *et al.*, 1995).

VEGF121 y VEGF165 son isoformas ácidas y no se unen fácilmente a la heparina por lo que se han considerado como isoformas parcialmente solubles y altamente difusibles (Ferrara *et al.*, 1997). En mamíferos se ha detectado la expresión de estas isoformas, las cuales están relacionadas con la angiogénesis durante el desarrollo folicular (Shimizu *et al.*, 2007). Las isoformas VEGF189 y VEGF206 son isoformas básicas que se encuentran asociadas a la matriz extracelular haciéndolas insolubles y con menor difusión (Ferrara *et al.*, 1997). La isoforma VEGF189 también ha sido encontrada en ovarios de bovino (Greenaway *et al.*, 2004). Finalmente la isoforma VEGF145 es expresada principalmente por células cancerosas del sistema reproductor femenino humano (Elias *et al.*, 2008).

Adicionalmente, por corte y empalme en el exón 8, se generan isoformas con el mismo número de aminoácidos, pero diferente secuencia en el extremo C- terminal (también conocido como carboxilo terminal), haciéndolas distintas funcionalmente (Nowak *et al.*, 2008). Cuando en el corte y empalme se conserva la región proximal del exón 8, se forman isoformas angiogénicas (VEGFxxx), mientras que, si conserva la región distal, se sintetizan las isoformas anti angiogénicas (VEGFxxx<sup>b</sup>). La primera isoforma anti angiogénica identificada de esta familia fue la VEGF165<sup>b</sup>, la cual se encontró en tejido cortical renal, posteriormente se han estudiado isoformas como 121<sup>b</sup>, 189<sup>b</sup> y 145<sup>b</sup> en tejidos humanos normales (Cui *et al.*, 2004; Varey *et al.*, 2008).

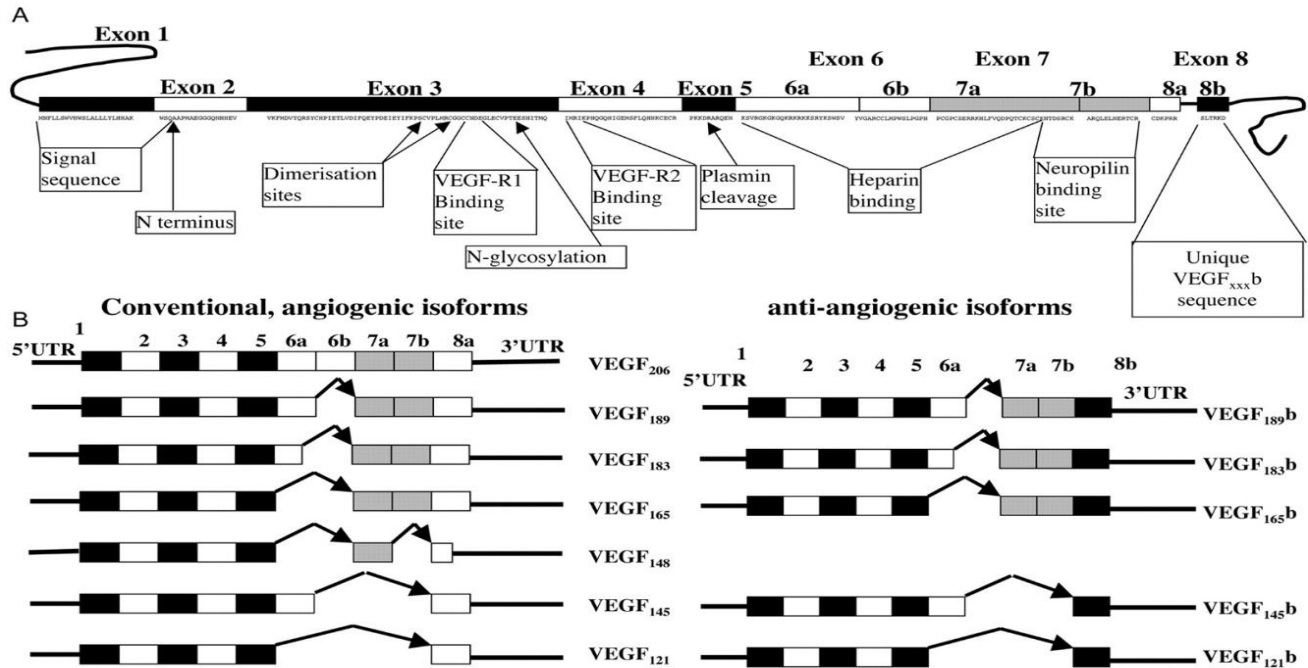


Imagen 1. Estructura del gen VEGF y variantes de empalme identificados de VEGF-A. (A) de longitud completa de VEGF. (B) Dos familias de isoformas de VEGF, VEGF xxx y VEGF xxxb.(Nowak et al., 2008)

### 2.3.2. Proceso de corte y empalme

El proceso de corte y empalme o splicing es fundamental para la regulación génica. Éste es un proceso post transcripcional en el cual son identificadas y eliminadas secuencias no codificantes (intrones) por medio de un complejo llamado espliceosoma el cual identificará el sitio de corte en el ARNm para dar paso a la conservación de las secuencias codificantes (exones) los cuales se empalman para producir un ARNm maduro el cual posteriormente será utilizado para la traducción de proteínas. El espliceosoma, consta de cinco partículas de ribonucleoproteicas (ARN pequeños de no más 150 aminoácidos) U1, U2, U4, U6 y U5 (snRPN, de small nuclear Ribonucleic proteins) y más de 200 proteínas auxiliares (Wahl *et al.*, 2009). En el pasado se creía que cada gen tenía una sola oportunidad de realizar el proceso de splicing por lo cual sólo codificaba para una proteína, actualmente se sabe que las células no solo son capaces de reconocer con precisión los exones, sino que también son capaces de

reconocer exones alternativamente para posteriormente dar origen a isoformas que provienen del mismo transcrito primario (Black, 2003).

#### 2.3.2.1. Corte y empalme alternativo (splicing alternativo)

El proceso de corte y empalme alternativo es un mecanismo para modular la expresión de genes celulares y virales el cual le permite a un solo gen aumentar la capacidad de codificar diferentes proteínas. Las isoformas de VEGF mencionadas anteriormente representan a la familia de un gen cuya expresión está regulada por este proceso. En este proceso un exón se incorpora al ARNm o se elimina como parte de un intrón, lo que da como resultado diversas formas de ARNm maduro como se muestra en la imagen 2, el cual contendrá diferentes secuencias de aminoácidos que darán origen a proteínas con diferente estructura y función (Ferrara, 2004). Un análisis bioinformático muestra que el 90% de los genes humanos están empalmados alternativamente (Amory *et al.*, 2008).

Los ARNm procesados alternativamente contienen información que codifica diferentes proteínas con funciones que además pueden ser opuestas, dependiendo del tejido o del tipo celular. Existen secuencias reguladoras que localizan a los exones e intrones y pueden favorecer o inhibir un proceso de corte y empalme. Además, algunas proteínas de unión a ARN entre las que destacan las hnRNPs (Heterogeneous Nuclear Ribonucleoproteins) y las proteínas SR (serine/Arginine- rich proteins) también pueden modificar el corte y empalme alternativo de un gen, lo cual dependerá de la disponibilidad de estos factores, del grado de expresión, de su localización o de sus modificaciones post traduccionales (Shepard *et al.*, 2009) .

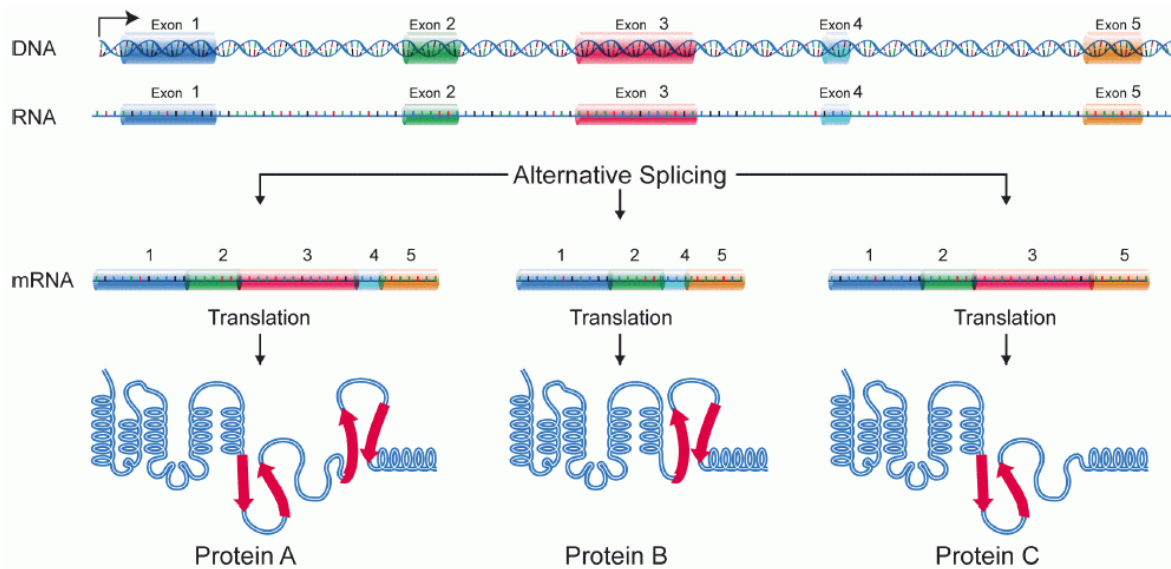


Imagen 2. Corte y empalme alternativo. A partir del mismo pre ARN se puede dar la exclusión/inclusión de exones alternativos dando lugar a diferentes proteínas (National Human Genome Research Institute)

#### 2.4. Receptores de membrana

Las isoformas del VEGF llevan a cabo su mecanismo de acción por su unión a alguno de estos tres receptores: VEGFR-1 (también conocido como Flt-1), VEGFR-2 (KDR o Flk-1) y VEGFR-3 (Flt-4) (Ferrara *et al.*, 2003). Estos receptores contienen siete dominios homólogos a inmunoglobulina (Ig) en su parte extracelular, una región transmembranal y un dominio intracelular de señalización tirosina cinasa interrumpido por un inserto de cinasa de 69 aminoácidos en la región carboxi-terminal (Baijun *et al.*, 2004; Ferrara *et al.*, 2003). El segundo y tercer dominio parecido a Ig en la región extracelular, representa la región donde se une al ligando, mientras que las regiones del cuarto al séptimo dominio de Ig son esenciales para la dimerización de los receptores (Shibuya, 2001). El VEGF se une principalmente a VEGFR-1 y VEGFR-2, aunque también puede unirse a correceptores como las neuropilinas (NRP) (Ferrara *et al.*, 2003) mediante secuencias específicas en el extremo carboxilo y a otros receptores de la superficie celular, por vías distintas a las de los dominios de unión a la heparina (Veikkola *et al.*, 2000). Los receptores VEGFR1 y VEGFR2 con la unión del ligando, se dimerizan y experimentan trans-autofosforilación, desencadenando una cascada de señalización fosforilando

distintas proteínas, como la proteína cinasa-C (PKC), fosfolipasa C-gamma (PLC- $\gamma$ ), fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) y el blanco de rapamicina en mamíferos (mTOR), regulando mecanismos involucrados en angiogénesis, activados por el VEGF (Harold F. Dvorak, 2005).

El VEGFR-1 es una glicoproteína transmembranal de 180 KDa, tiene mayor afinidad ( $K_d=10\sim 20$  pM) por VEGF y menor capacidad fosforilativa por lo que algunos le han llamado receptor anzuelo, probablemente con efectos anti angiogénico, por competir con el VEGFR-2 por el ligando (Ferrara *et al.*, 2003). El VEGFR-1 se encuentra expresado principalmente en las células endoteliales, aunque también se encuentra en macrófagos, monocitos y células madre hematopoyéticas (Kosaka *et al.*, 2007; Shibuya, 2006), así como en células de la granulosa y teca de folículos ováricos (Ortega *et al.*, 2016).

La transcripción del VEGFR-1 se incrementa por la hipoxia, aunque probablemente no induce proliferación celular debido a que las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) no son activadas por este receptor, sí promueve la generación de proteasas como la metaloproteasa de matriz extracelular 9 (MMP-9), las cuales son requeridas para la degradación de la membrana basal de los vasos sanguíneos en las etapas iniciales de la angiogénesis (Dvorak, 2005).

El receptor VEGFR-2, es una proteína de 230 KDa con menor afinidad ( $K_d= 75$  a  $125$  pM) por VEGF pero mayor actividad que VEGFR-1 (Waltenberger *et al.*, 1994). Este receptor se une a VEGF-A así como a VEGF-C y D pero únicamente la forma glicosilada final del VEGFR-2 es capaz de auto fosforilarse en respuesta al VEGF (Yonemura *et al.*, 2001) .El VEGFR2 tiene un papel importante en la angiogénesis en el desarrollo y la hematopoyesis, siendo el mayor mediador de los efectos mitogénicos, angiogénicos y del aumento de la permeabilidad vascular de VEGF. Este receptor también tiene una respuesta migratoria cuando es activado por VEGF (Ferrara *et al.*, 2003; Gille *et al.*, 2001). Aunque la producción de este receptor aumenta bajo condiciones de hipoxia, ésta no es su principal inductora, se propone que un mecanismo postranscripcional pudiera ser el responsable de su sobre expresión (Yonemura *et al.*, 2001). La activación de este receptor es suficiente para la activación de transductores de señales involucrados en la

mitogénesis y migración celular, así como en la maquinaria angiogénica y la permeabilidad vascular (Gille *et al.*, 2001).

El VEGFR-3 es un receptor tirosina cinasa de superficie celular altamente glicosilado y relativamente estable de 180 KDa aproximadamente. Actualmente se conocen dos formas transcritas que difieren entre sí por sus extremos carboxilo (Gille *et al.*, 2001). Después de la biosíntesis, la forma glicosilada del VEGFR-3 de 195 KDa, es cortada proteolíticamente en el quinto dominio de Ig, aunque las cadenas resultantes de 120 KDa y 75 KDa, permanecen unidas por un enlace disulfuro (Veikkola *et al.*, 2000). A pesar de que el VEGF-A no se une a este receptor. El VEGFR-3 se expresa en las células endoteliales vasculares en las etapas tempranas del desarrollo, mientras que después de la organogénesis permanece restringido a las células endoteliales linfáticas (Gille *et al.*, 2001).

La NRP-1 y NRP-2 son receptores glicoprotéicos sin actividad de cinasa ubicados en la superficie celular, que se unen a proteínas implicadas en la señalización para la guía neuronal como las colapsinas/ semaforinas (PIGF-2, VEGF-A165, VEGF-B y VEGF-E (Dvorak, 2005). La Nrp-1 de 130-135 KDa contiene solo una cola intracitoplásmica corta y se sugiere que aumenta la unión de VEGFA165 con el VEGFR-2, actuando a manera de correceptor; sin embargo, no existe evidencia de que las NRP señalen después de unirse al VEGF (Ferrara *et al.*, 2003).

## 2.5. Receptores solubles

Una variante de los receptores de membrana VEGFR1 y VEGFR2 son los receptores solubles sVEGFR1 y sVEGFR2 que se forman a partir de un proceso de corte y empalme alternativo del ARNm inmaduro de sus respectivos receptores de membrana (Hornig *et al.*, 1999). Estos receptores solubles tienen un peso de 110 KDa y se caracterizan por no poder traducir señales intracelulares porque carecen de los dominios transmembranal e intracelular y solo conservan los dominios de unión al ligando, de esta manera mantienen su afinidad por VEGF y compiten con los receptores de membrana por el ligando (Baijun *et al.*, 2004; Ebos *et al.*, 2004). Estos receptores solubles se pueden unir a todas las isoformas reportadas para VEGF por lo cual reduce la biodisponibilidad de VEGF (Khuda *et al.*, 2005).

La transcripción de los genes de VEGFR1 y VEGFR2 puede someterse a una transformación en 3' y la poliadenilación ocurre río abajo del exón, en este caso se forman los receptores transmembranales dando origen a las formas completas de estos receptores, Pero si la poliadenilación ocurre en el intrón 13 se da origen a las formas solubles las cuales por supuesto son secuencias mucho más cortas. En este último caso, las porciones transmembranales e intracelulares de la proteína se pierden, por lo tanto, se vuelven incapaces de transmitir la señal de VEGF intracelularmente (Baijun *et al.*, 2004)

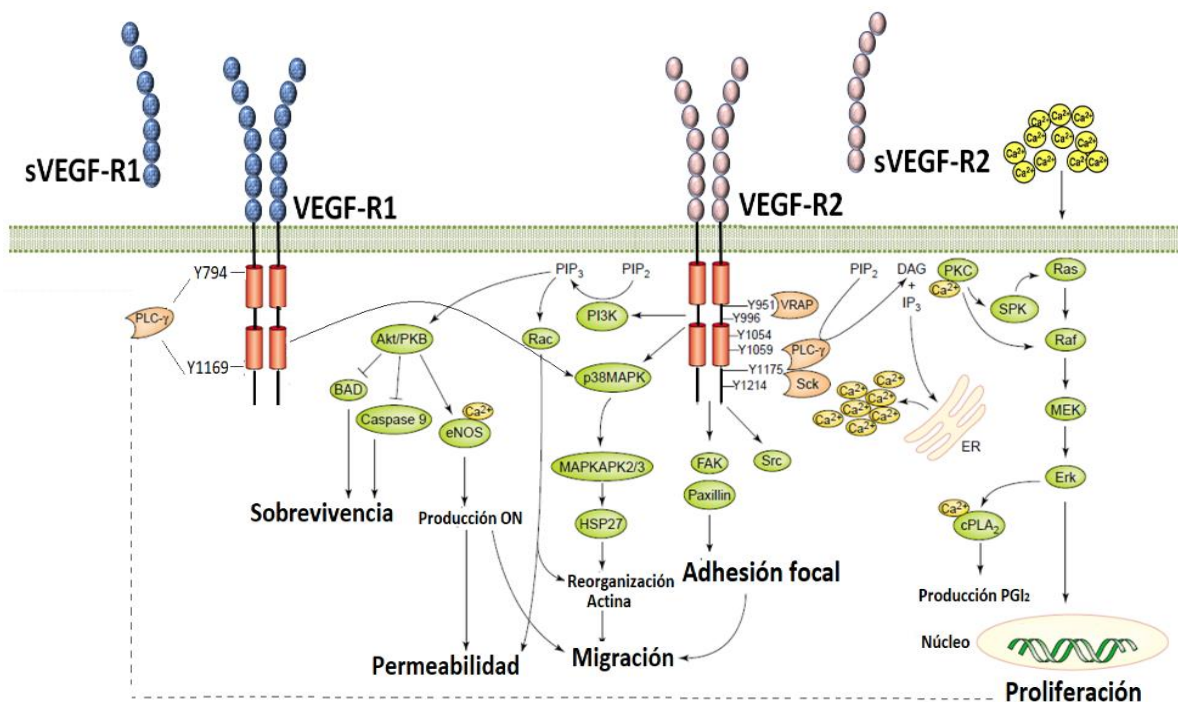


Imagen 3. Señalización intracelular inducida por VEGF al unirse con los principales receptores de membrana. Modificada de Cross *et al.*, (2003)

## 2.6. Angiogénesis folicular

La angiogénesis es un proceso en el cual se forma un vaso sanguíneo nuevo a partir de uno ya existente, la angiogénesis es un proceso normal durante el desarrollo embrionario, cicatrización de heridas, desarrollo folicular y el crecimiento tumoral (Toshihiro Shimizu *et al.*, 2003). El proceso de angiogénesis incluye la migración, vasodilatación y proliferación de células endoteliales, la formación de estructuras

tubulares posteriormente se unirá y finalmente madurarán en vasos sanguíneos, actualmente se reconoce a VEGF como el principal regulador de la angiogénesis (Irusta *et al.*, 2010). Todos los organismos requieren de sistema que les proporcione a las células una fuente de nutrientes y oxígeno, VEGF a través de la vía de señalización y sus recetores se encarga de regular la formación de vasos sanguíneos (Khuda *et al.*, 2005).

Los procesos angiogénicos que ocurren en el aparato reproductor de las hembras de los mamíferos adultos ocurren cíclicamente durante el ciclo ovárico y uterino, así como durante el embarazo. La angiogénesis durante el desarrollo folicular los folículos preantrales no cuentan con un suministro vascular propio, por su parte los folículos antrales adquieren un aporte vascular por parte de las células de la teca (Irusta *et al.*, 2010). El desarrollo de una red vascular adecuada interviene en el desarrollo y selección del folículo ovulatorio, el aumento de la vasculatura da como resultado una fuente confiable de suministro de gonadotropinas, oxígeno y nutrientes que le permitan al folículo seguir con su desarrollo y poder desarrollar ventajas sobre la maduración en folículos preovulatorios (Ferrara *et al.*, 2003). En un estudio con monos titi se dieron cuenta que la vascularización comienza en folículos secundarios, aumenta durante su desarrollo y disminuye durante la atresia folicular y está mediada por VEGF debido a que se vio su expresión en células de la granulosa de folículos secundarios y su receptor se encontró en células de la teca, células de la granulosa y células endoteliales (Taylor *et al.*, 2007).

La angiogénesis en mamíferos es importante para la formación del cuerpo lúteo así como para su mantenimiento, las capas de células de la granulosa son avasculares hasta que la hormona luteinizante (LH) aumenta, las capas de las células de la teca invaden las células de la granulosa que da como resultado el primer paso de la formación del cuerpo lúteo (Tamanini *et al.*, 2004). Posteriormente los vasos sanguíneos se crean en el cuerpo lúteo que posteriormente dentro de los 7 días posteriores a la ovulación forma el órgano más vascularizado (Reynolds *et al.*, 2000). Ferrara y colaboradores en 2005, demostraron que VEGF era un factor importante durante el proceso de angiogénesis de diferentes órganos incluyendo el cuerpo lúteo,



estudios recientes demuestran que la angiogénesis mediada por VEGF es necesaria durante la formación del cuerpo lúteo en distintas especies animales (Fraser *et al.*, 2005). El ARNm de isoformas como VEGF 121 y 165 se han detectado y sus niveles se mantienen constantes durante la formación del cuerpo lúteo para después disminuir durante su regresión (Sugino *et al.*, 2000).

## 2.7. Evidencias de la participación del Sistema VEGF en ovario de diferentes especies

En distintos estudios se ha demostrado que la expresión de VEGF en folículos de distintas especies y la angiogénesis acompañan al crecimiento y selección folicular (Berisha *et al.*, 2000). En un estudio realizado en primates, se demostró que la densidad de la red vascular del folículo seleccionado es al menos el doble que el de los folículos de menor madurez. Este aumento en la capilaridad media el aporte de la hormona gonadotrópica al folículo seleccionado *in vivo* (Zeleznik, 2004). La acción de VEGF provoca que estas produzcan enzimas que degraden proteolíticamente su matriz extracelular subyacente, invadan y migren direccionalmente hacia el estímulo angiogénico para que proliferen y organicen nuevos capilares (Ferrara, 2004). El VEGF también puede tener una función de supervivencia para las células endoteliales de los capilares que rodean a las células de la teca (Ferrara *et al.*, 2003). En bovinos se ha reportado que la presencia de VEGF es importante durante la angiogénesis folicular, debido a que los folículos que llegan a la dominancia presentan una red vascular extensa que provee a los folículos de los elementos necesarios para continuar con su crecimiento (Rosales-Torres *et al.*, 2010). En distintos estudios realizados se ha reportado que la expresión de VEGF aumenta con el desarrollo folicular, de esta manera los folículos con menos desarrollo muestran una expresión baja de VEGF comparada con la expresada en folículos más desarrollados (Greenaway *et al.*, 2005). Por otro lado se ha reportado en distintos estudios que la participación de VEGF incrementa la proliferación y viabilidad de células endoteliales en distintas especies induciendo la expresión de proteínas anti apoptóticas tales como Bcl-2 y A1 (Pidgeon *et al.*, 2001).

### 2.7.1. Evidencias de la importancia de las isoformas de VEGF

Se ha reportado que las isoformas de VEGF son importantes para el desarrollo de la angiogénesis y durante el desarrollo de los folículos en mamíferos (Robinson *et al.*, 2009). Las isoformas de VEGF, tienen diferentes patrones de secreción durante el desarrollo folicular lo que sugiere distintas funciones fisiológica (Rosales *et al.*, 2011). Se ha visto que las isoformas más pequeñas de VEGF, son secretadas por las células y actúan paracrinamente, mientras que las isoformas grandes están asociadas a la ECM y pueden actuar de manera autocrina. Las actividades biológicas de cada isoforma están mediadas por la afinidad con sus receptores VEGFR1 y VEGFR2, principalmente (Ferrara *et al.*, 2003). En células foliculares de mamíferos no siempre se encuentran expresadas todas las isoformas. Las isoformas más abundantes en bovinos (Greenaway *et al.*, 2004) y porcinos (Barboni *et al.*, 2000) son 164 y 120, mientras que 188 solo ha sido reportada en bovinos, En humanos se expresan siete isoformas VEGF121, VEGF145, VEGF148, VEGF165, VEGF183, VEGF189 y VEGF205 (Lozada., 2006). A pesar de ello se sabe poco sobre las funciones y mecanismos que controlan la expresión y cantidad de cualquier isoforma. La presencia de hormonas esteroides es importante en la expresión y regulación de distintas isoformas, en un estudio con células de la granulosa *in vitro*, la progesterona inhibió la expresión de ARNm de VEGF 164 y aumentó la expresión de VEGF 120. Por lo que se asume que la cantidad de las isoformas está relacionada con la etapa de desarrollo, así como con el proceso de atresia y desarrollo folicular. En un estudio realizado por Rosales en 2010 reportaron que en células foliculares de ovejas las isoformas 120, 164 y 188 se encontraron presentes en células de la granulosa y teca tanto en folículos sanos como atrésicos, los autores reportaron una reducción en la expresión de VEGF 120 y 164 en folículos atrésicos que fue más evidente en células de la granulosa que en células de la teca. En células de la teca el ARNm de todas las isoformas de VEGF estudiadas, solo se redujeron en folículos con atresia avanzada.

### 2.7.2. Evidencias de la importancia de los receptores de VEGF

El VEGF interactúa con sus receptores de membrana en las células diana para llevar a cabo sus efectos. En un principio se creía que el receptor VEGFR2 o Flk-1 era el

principal receptor de VEGF y que solo se expresaba en células endoteliales, sin embargo, en un estudio realizado por Greenaway y colaboradores en el 2004, demostraron la participación de VEGF y su receptor VEGFR1 en la supervivencia de células foliculares de bovinos y roedores. Así mismo los receptores de VEGF se han visto presentes en células de la granulosa, células de la teca y células lúteas de bovino (Guzmán, *et al.*, 2015; Rosales *et al.*, 2012; Zamora-*et al.*, 2019). El CL se observó un aumento de la expresión de VEGFR2 en la fase lútea temprana, seguida de una disminución conforme se desarrollaba el cuerpo lúteo (Berisha *et al.*, 2000). Greenaway y colaboradores en 2004 demostraron que la expresión de VEGFR2 se relacionó con la salud del folículo durante el desarrollo folicular reduciendo la acción de las caspasas activas, así como la disminución de la expresión de VEGFR2 se asoció con la atresia folicular viéndose aumentada la expresión celular de la caspasa-3 activa. Un estudio realizado en cultivos de células de la granulosa de bovinos, demostró que la adición de progesterona incrementaba la expresión de la proteína VEGFR2 mientras que si las células eran tratadas con progesterona y estradiol, la expresión de este receptor disminuye, lo que sugiere que la presencia hormonal durante el desarrollo folicular es importante para la regulación de la expresión de VEGFR2 (Kosaka *et al.*, 2007). Doley y colaboradores en 2010 determinaron la expresión de la proteína VEGFR2 en células de la granulosa de bovinos y encontraron que esta expresión puede ser determinante para la sobrevivencia y proliferación.

Como se dijo antes, los receptores sVEGFR1 y sVEGFR2, son reguladores negativos de VEGF (Ahmad *et al.*, 2011). En un estudio realizado por Macias y colaboradores en 2012, demostraron la expresión del ARNm y proteína de sVEGFR1 y sVEGFR2, en células de granulosa y teca de folículos dominantes de los días 4, 6 y 9 del ciclo en bovinos, ellos encuentran que la expresión de sVEGFR1 aumentó en los folículos del día 4 y en el día 6 y 9, lo cual fue contrario para sVEGFR2, se sugieren que la presencia de los receptores solubles reduce la disponibilidad de VEGF y provocan la pérdida de la dominancia folicular.

La selección del folículo dominante en bovinos está relacionado con la disminución de la expresión de ARNm de los receptores solubles de VEGF (sVEGFR1 y sVEGFR2).

Por otra parte, la expresión de ARNm del VEGFR2 es mayor que la de VEGFR1 en folículos subordinados que en folículos dominantes. Por lo que se concluye que los folículos pueden evitar la atresia si reducen sus niveles de sVEGFR1 y sVEGF2 dando lugar a que el ligando VEGF interactúe con el receptor de membrana VEGFR2 y promover las señales de salud al folículo (Ortega *et al.*, 2016).

## 2.8. Sistema VEGF en gallinas

En pollos (Baum *et al.*, 2010) y codornices (Flamme *et al.*, 1995), se han encontrado al menos cuatro isoformas de VEGF: VEGF122 (exón 1-2-3-4-5-8), VEGF146 (exón 1-2-3-4-5-6-8), VEGF166 (exón 1-2-3-4-5-7-8) y VEGF190 (exón 1-2-3-4-5-6-7-8). En cuanto a los receptores de VEGF en gallinas se ha reportado que la expresión de sus receptores de membrana están relacionados con la salud del folículo en diferentes estadios del desarrollo folicular (Kim *et al.*, 2016). Hasta el momento se sabe que el gen de VEGFR1 está expresado durante el desarrollo embrionario en pollos y está altamente conservado, al igual que en mamíferos el gen de VEGFR1, codifica para el receptor de membrana y el soluble sVEGFR1. Al igual que en mamíferos, en aves el sVEGFR1, conserva el dominio de unión al ligando de VEGFR1 compitiendo así por la unión por este, por lo que juega un papel importante en la regulación negativa de la angiogénesis durante el desarrollo embrionario (Yamaguchi *et al.*, 2002). El VEGFR2 se expresa en células foliculares de gallina y su expresión se vio relacionada con la salud del folículo (Kim *et al.*, 2016). En cuanto a la forma soluble de este receptor, en gallinas no se tiene registro de su presencia.

## 2.9. Dinámica folicular en gallinas

El ovario de las aves está formado por dos zonas: una periférica o corteza ovárica y otra interna o médula. En la corteza es externa y en ella se encuentran folículos en diferentes estadios de desarrollo, incluyendo los postovulatorios y los atrésicos (Altamirano *et al.*, 2009). Cada folículo está unido al ovario por un pedúnculo, por donde penetran arterias, venas y el sistema nervioso. Los folículos están formados por el ovocito, por células de la granulosa y células de la teca interna y externa que van determinando su crecimiento y diferenciación en varias clases de folículos (McDonal, 2011; Johnson, 2015).

Las gonadotropinas son las hormonas responsables del crecimiento y selección folicular (McDonal, 2011). A diferencia de los mamíferos las células de la granulosa son las principales productoras de progesterona y pequeñas cantidades de andrógenos y las células de la teca interna producen testosterona y la teca externa que son las encargadas de producir estradiol (Bardales, 2017).

Los distintos folículos de las gallinas se distinguen en dos principales grupos, el primer grupo comprende los folículos blancos pequeños con un diámetro menor a 2mm, seguido de folículos blancos grandes de un diámetro de 2 a 4 mm y por último pequeños folículos amarillos pequeños con un diámetro de 4 a 8 mm. En el segundo grupo están los folículos amarillos grandes usualmente con un diámetro de 9 mm que tendrán un crecimiento rápido, en promedio 9 días para alcanzar el tamaño ovulatorio (35 mm) (Johnson, 2012).

Los folículos pre jerárquicos miden 2-8mm de diámetro poseen una membrana que rodea al ovocito llamada membrana perivitelina, una multicapa de células de la granulosa, la capa más interna están en contacto con el ovocito, membrana basal, células de la teca interna compuesta por células esteroidogénicas y externa la cual es capaz de producir esteroides ; las células de la teca externa presentan innervaciones y es la zona vascularizada mientras la teca interna brinda soporte y está conformada por fibras de colágeno, fibroblastos y células musculares lisas (Robinson *et al.*, 2009). En esta etapa los folículos pre jerárquicos adquieren la capacidad esteroidogénica. El crecimiento hasta folículo pre jerárquico (6 a 8mm) se da por la acumulación de yema blanca rica en lipoproteínas y por la diferenciación de la teca externa e interna. En los folículos pre jerárquicos el crecimiento es lento y son susceptibles a sufrir atresia como proceso normal durante su desarrollo, comenzando con la apoptosis de las células de la granulosa. Conforme avanza el crecimiento de estos folículos las células de la granulosa forma una monocapa con alta capacidad proliferativa. El desarrollo de los folículos pre jerárquicos está mediado por la hormona folículo estimulante (FSH), la cual es responsable de que estos folículos ingresen a la categoría de folículos jerárquicos induciendo la producción de progesterona (P4) por parte de las células de la granulosa. Estudios demuestran que se han encontrado una mayor concentración

de receptores a FSH en células de la teca y granulosa en folículos pre jerárquicos (6-8mm) durante la transición al estadio jerárquico (Rangel & Gutierrez, 2014).

Folículos preovulatorios o jerárquicos en el ovario de la gallina se presentan de 5-6, se distinguen con la siguiente nomenclatura F1, F2, F3, F4 y F5 siendo F1 el de mayor tamaño y el más próximo a ovular (Johnson *et al.*, 2000). El folículo está rodeado también por epitelio ovárico y tejido conjuntivo que forman una pared muy vascularizada excepto en la zona del estigma, una región avascular por donde se romperá el folículo en la ovulación (Johnson, 2015). En folículos jerárquicos la capacidad para producir progesterona va aumentando tanto que el mayor productor de progesterona es el folículo preovulatorio o F1 el cual es encargado de dar el pico pre ovulatorio de P4 en respuesta a la capacidad que tiene para responder a la LH. En esta etapa del folículo contiene más receptores a LH que receptores a FSH y además producen gran cantidad de progesterona (Johnson *et al.*, 2000). LH es una hormona fundamental para la maduración de estos folículos y la estimulación de la esteroidogénesis. Mientras esto ocurre la producción de testosterona (T) va aumentando gradualmente, siendo el folículo F3 el mayor productor de esta hormona, sin embargo, el folículo F1 pierde la capacidad de transformar P4 en andrógenos alrededor de 12 horas antes de la ovulación (Rangel *et al.*, 2006). En esta etapa los folículos ya no sufren atresia y cada día el folículo más grande (F1) es ovulado, mientras que otro entra a la jerarquía. En estos folículos el crecimiento es rápido de siete a nueve días aproximadamente para llegar a ovular. Los folículos jerárquicos no sufren atresia debido a que de manera independiente la P4 y FSH estimulan la sobrevivencia de las células de la granulosa (Johnson, 2012).

Folículo post ovulatorio, se considera así a las capas de células de la granulosa y células de las tecas que quedan después de la ruptura del folículo por el estigma. La capacidad de seguir produciendo hormonas por parte de estas células durará pocos días después de la ovulación, éstas serán reabsorbidas en el ovario (Woods *et al.*, 2005).

### 3. Objetivo general

Examinar y analizar la presencia de isoformas de VEGF, receptores de membrana y receptores solubles para VEGF en células de folículos jerárquicos de gallina

### 4. Objetivos particulares

- Demostrar la presencia de isoformas de VEGF en células de la granulosa y teca de folículos jerárquicos de gallina.
- Demostrar la presencia de los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 en células de la granulosa y teca de folículos jerárquicos de gallina.
- Demostrar la presencia de los receptores solubles sVEGFR-1 y sVEGFR-2 en células de la granulosa y teca de folículos jerárquicos de gallina.

### 5. Hipótesis

Las células de la granulosa y de la teca de folículos jerárquicos de gallinas expresan ARNm para isoformas de VEGF, de los receptores de membrana VEGFR1, VEGFR2 y de los receptores solubles sVEGF-R1 y sVEGFR2.

### 6. Planteamiento del problema

El crecimiento de un folículo preovulatorio requiere del desarrollo de una vascularización suficiente que garantice el aporte de nutrientes, oxígeno y hormonas que son necesarios para cubrir las demandas del desarrollo folicular. Las células foliculares son expuestas a concentraciones decrecientes de oxígeno y se ha propuesto que VEGF facilita su desarrollo en estas condiciones. Existen por lo menos 6 isoformas de VEGF que se forman por corte y empalme del ARNm. La presencia o ausencia de exones, determina la isoforma de VEGF y las características de cada una de ellas. Las isoformas VEGF164 y VEGF120 son las más abundantes en distintos tejidos de la mayoría de las especies, su expresión se ha encontrado en ovario de mamífero y están asociados con efectos angiogénicos en el desarrollo folicular. VEGF164 también ayuda al crecimiento de células endoteliales proliferación, migración, vasodilatación. Además, una débil expresión de VEGF-189 se ha detectado en ovarios de bovino, esta isoforma se cree que es más potente en la vascularización en varios tipos de cáncer. Se sabe que la isoforma VEGF145 se expresa en cáncer de

ovario. En cuanto a los receptores de membrana y solubles se ha identificado que tienen una importante participación regulando la acción de las isoformas de VEGF durante el ciclo reproductivo de hembras de los mamíferos. Existe poca información para comprender con precisión la función que desempeñan las isoformas de VEGF en los diferentes tejidos y es más escasa para el caso de las células foliculares durante el desarrollo folicular. En el caso de aves específicamente en codornices se sabe de la presencia de al menos 4 isoformas VEGF122, VEGF146, VEGF166 y VEGF190 estas mismas isoformas, han sido expresadas en diversos tejidos de pollos durante el desarrollo embrionario. Estas isoformas en aves son equivalentes a las reportadas en mamíferos, pero con un aminoácido más cada una.

En folículos ováricos de gallinas, se desconoce la existencia de isoformas de VEGF y la dinámica e importancia del sistema VEGF durante el desarrollo de los folículos ováricos, tal como se conoce en mamíferos. Por esta razón y en virtud que las gallinas por tener un ciclo folicular de aproximadamente 24 horas, puede resultar un modelo interesante para comprender la presencia y participación de isoformas y receptores en la dinámica folicular de las especies, la propuesta de este trabajo es reconocer e identificar por métodos moleculares la presencia de isoformas de VEGF, receptores de membrana (VEGFR1, VEGFR2) y receptores solubles (sVEGFR1 y sVEGFR2) en células de la granulosa y teca de folículos jerárquicos de gallinas.

## 7. Materiales y métodos

### 7.1. Lugar de realización

El estudio se realizó en el laboratorio de Bioquímica de la Reproducción en la UAM-X y en el Depto. de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la UNAM. Todos los protocolos de manejo de animales fueron aprobados por el Comité de Ética y Bienestar Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Para la recolección de folículos se seleccionaron 4 gallinas ponedoras Leghorn. Las gallinas se alojaron en la FMVZ en un cuarto con fotoperiodo controlado con 14 h de luz y 10 h de oscuridad y temperatura ambiente. Los animales se mantuvieron en jaulas individuales y se les proporcionó agua y comida *ad libitum*. Previo al estudio, las gallinas se adaptaron a su alojamiento por 3 meses hasta que se



obtuvo una producción constante de huevo, lo cual se monitoreó mediante el uso de videocámaras que grabaron el momento de la ovoposición.

## 7.2. Obtención de folículos, células de la granulosa y células de la teca

Se sacrificaron 4 gallinas 4 horas después de la ovulación, por el método de dislocación cervical, posteriormente se extrajeron los folículos jerárquicos F1 y F2 (35 mm- 40mm), así como el hígado de una de las gallinas. Los folículos recolectados se pusieron en solución de NaCl al 0.154 M estéril enfriada con hielo. Para separar las células de la granulosa de la teca, se hizo un corte por la zona del estigma del folículo, por esa abertura se extrajo el vitelo y con precaución de no romper las células se separaron de la granulosa y las células de la teca para cada uno, posteriormente se realizaron lavados de las capas de las células de la granulosa y teca para quitar el exceso de vitelo de acuerdo a lo descrito por Rangel *et al.* (2014).

## 7.3. Extracción de ARN total

La extracción de ARN total de hígado, células de la granulosa y teca se realizó por el método de tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo descrito por Chomczynski y Sacchi (1987). Para las células de la granulosa y de teca se realizó un pool con los folículos jerárquicos F1 y F2. Las células se homogeneizaron con un homogeneizador de vidrio-vidrio (homogeneizador Heidolph, tipo RZR1). Por cada 100 mg de tejido se agregó 1 ml de trizol (Invitrogen, No de Cat 15596018), se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente y se homogeneizó. Se agregaron 500 µl de cloroformo a los homogeneizados, se incubaron por 5 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12000 rpm a 4°C por 15 min. Posteriormente se extrajo la fase acuosa (ARN) de cada muestra y se depositó en tubos cónicos nuevos de 1.5 ml, se agregaron 500 µl de isopropanol, se incubaron a temperatura ambiente por 10 min y se centrifugaron a 12000 rpm a 4°C durante 10 min. posteriormente se retiró el sobrenadante y los precipitados se dejaron secar. Se realizó un lavado con etanol al 75%, y las muestras se centrifugaron a 7500 rpm a 4°C durante 10 min, posteriormente se retiró el etanol y se dejaron secar completamente los pellets, finalmente las muestras se resuspendieron en 50µl de H<sub>2</sub>O estéril. La calidad y cantidad de ARN total obtenido se verificó mediante un espectrofotómetro UV-Vis, (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) se tomaron 2 µl y se

medió a una absorbancia de 260 y 280 nm posteriormente se almacenaron a -70°C para su posterior uso.

La integridad del ARN total, se verificó realizando un gel de agarosa (UltraPure™ Agarose; Invitrogen™ No. Cat. 16500-500) al 2% en Tris de Acetato (TAE) como amortiguador de corrida (60.5 g Tris Acetato 0.04M, 14.2 ml de acetato acético glacial y 4.6 g EDTA 0.5M en un pH 8.0) usando 5 µl de ARN y 1 µl de GelRed. Todos los geles se corrieron con un marcador de peso molecular de 50 pb (Labber, Promega USA) en una cámara horizontal de electroforesis a 100 mV/min por 1 hora. Posteriormente el gel se observó en un transiluminador BioChemi-Darkroom (UVP BioimagingSystems).

#### 7.4. PCR punto final

Para determinar la expresión del ARNm de las isoformas de VEGF y sus receptores se realizó una PCR punto final para la amplificación de los genes con iniciadores específicos para cada gen, que fueron diseñados en el programa Ensambl, en el laboratorio de bioquímica de la reproducción. Para el diseño de primers, se usaron secuencias registradas para *Gallus gallus* en el GenBank del NCBI: AB011078.1 para VEGF, NM\_204252.1 para VEGFR1, AB065373.1 para sVEGFR1 y NM\_001004368.1 para VEGFR2 y sVEGFR2. Cabe mencionar que en el GenBank solo se encuentra el receptor soluble 1 (sVEGFR1) debido a que el receptor soluble 2 (sVRGFR2) no está reportado aun en gallinas. Se usaron primers sentido y anti sentido con las siguientes secuencias:

Tabla 1. Secuencia de primers usados en PCR punto final.

Gen	Secuencia 5' 3'	Ubicación de primer	Amplificación
ISOFORMAS			
VEGF	<b>Forward:</b> 5'-TCAGCACATAGCGCACATGA-3'	Ex4 - F	
AB011078.1	<b>Reverse:</b> 5'-TTTCCGCTGCTCACCGT-3'	Ex8 - R	
RECEPTORES			
VEGFR1 (Flt-1)	<b>Forward:</b> 5'-GTTCTCGGAGCTGGTGAAG-3'	Ex 26 – F	103 pb
NM_204252.1	<b>Reverse:</b> 5'-GCTTTCCGCTGTGAAGATAGT-3'	Ex 27 - R	
sVEGFR1 (sFlt-1)	<b>Forward:</b> 5'-ACCTA TACCT GCCGA GCAA-3'	Ex 13 – F	129 pb
AB065373.1	<b>Reverse:</b> 5'-GTGTT CTTAT ATTTG AGGAT CCGAG-3'	In 13 - R	
VEGFR2 (Flk-1)	<b>Forward:</b> 5'-AGGAG GAAGA GGAAG TCTGT G-3'	Ex 27 – F	102 pb
NM_001004368.1	<b>Reverse:</b> 5'-CACTC ACAGG TCGGC TTT-3'	Ex 28 - R	
sVEGFR2 (sFlk-1)	<b>Forward:</b> 5'-GCTCA GGACA AGAAG GCTAAA-3'	Ex 13 – F	79 pb
	<b>Reverse:</b> 5'-CTCAC GGCAA GAGAT CCATA-3'	In 13 - R	

\*El amplificación de VEGF varia depende de los exones presentes en el ARNm

Se utilizó el estuche comercial SuperScript™ One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen, LifeTechnology, No de Cat. 10928042) siguiendo las instrucciones del proveedor: se realizó una mezcla de 1µg de ARN total; 25 µl de 2x reacción mix, 1 µl del primer forward (18 pMol/µl), 1 µl de primer reverse (18 pMol/µl), 1 µl de RT/platinum polimerasa y 0.6 µl de MgSO<sub>4</sub> (50Mm) llevando a un volumen final de 50µl con agua estéril. Las reacciones se realizaron de acuerdo a las siguientes condiciones de ciclado: 50°C/30 min; 94°C por 2 minutos y 30 ciclos a 94°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos y 70°C por 60 segundos y una extensión final de 72°C por 15 minutos, en un termociclador de gradiente (Mastercycler gradient, Eppendorf).

Los productos de RT-PCR se analizaron por electroforesis, para lo cual se tomaron 3  $\mu$ l de ADNc a los cuales se les adicionó 1  $\mu$ l de GelRed. La mezcla se colocó en un gel de agarosa al 2% disuelto en TAE y se corrió a 100mV/min por 1 hora. Todos los geles se corrieron con un marcador de peso molecular de 50 pb. (Ladder, Promega USA). Al finalizar la electroforesis, los geles se analizaron en un transiluminador BioChem-Darkroom (UVP BioimagingSystems).

#### 7.5. Purificación de fragmentos

Una vez que se identificaron las bandas correspondientes a cada uno de los genes de interés. Se cortaron los fragmentos del gel y se pusieron en tubos cónicos de 1.5 ml, posteriormente se realizó el proceso de purificación con el estuche comercial QIAquick gel Extraction Kit (Qiagen, Número de cat. 28704) siguiendo las indicaciones del producto como sigue:

1. Los fragmentos de gel cortados, se pesaron y se les adicionó 3 volúmenes del buffer QG por cada volumen de gel.
2. Se incubaron a 50°C durante 10 minutos y se mezclaron cada 3 min aproximadamente.
3. Se les agregó 1 volumen de isopropanol y se mezcló.
4. Cada mezcla se colocó en una columna QIAquick y se centrifugó a 3000 rpm por 1 minuto.
5. Se desechó el filtrado y se les agregó a cada columna 500  $\mu$ l de buffer QG, se centrifugaron a 3000 rpm por 1 min y se retiró el sobrenadante.
6. Posteriormente se lavaron con 750  $\mu$ l de buffer PE se dejaron reposar por 2 min y se centrifugaron a 3000 rpm por 1 min.
7. Se desechó el filtrado y se centrifugó a 13000 rpm por 1 min. Las columnas se colocaron en tubos cónicos nuevos de 1.5 ml y se les agregó 50  $\mu$ l de buffer EB se dejaron reposar por 1 min y se centrifugaron a 3000 rpm por 1 min.
8. Para finalizar se les agregó 30  $\mu$ l de buffer EB y se dejaron reposar, posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm por 1 min, este purificado se puso en hielo para posteriormente cuantificarlo.

Una vez obtenido el purificado de cada gen se cuantificó en el espectrofotómetro UV-Vis, (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) y se corrió un micro gel de agarosa al 2% con 3 µl de cada gen y 1 µl de GelRed. El gel se corrió con un marcador de peso molecular de 50 pb (Ladder, Promega USA) en una cámara horizontal de electroforesis a 100 volts durante 1 hora. Posteriormente se visualizaron las bandas de interés correspondiente a cada gen (conforme al tamaño del amplicón) en un transiluminador BioChemi Darkroom (UVP Bioimaging Systems). Las bandas se cortaron, se etiquetaron y se mandaron al Depto. de Genética Molecular en la FMVZ de la UNAM para su clonación y posterior secuenciación.

#### 7.6. Clonación y secuenciación

Se realizó la clonación de los genes obtenidos de la purificación, con el estuche comercial pUCM-T Cloning Vector Bio Basic Inc. siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se realizó el análisis de la secuencia de las clonas mediante la secuenciación de Sanger. El producto de la clonación se purificó y se agregó 200 ng a un tubo, se adicionó un primer específico (M13/3 pmol) en 20 µl del buffer de secuenciación 5x (BigDye). Este buffer contiene dNTPS, ddNTP marcados con fluorocromos, Taq polimersa. Esta mezcla se puso a ciclar en la máquina de PCR y después se limpió pasándola por una columna de sephadex. El filtrado se deshidrató y se mandó a leer en un secuenciador automático. Posteriormente se realizó el análisis de la secuencia de las clonas mediante la secuenciación de Sanger. Para las isoformas del ligando, se compararon la secuencia obtenidas con las reportadas en GenBank de VEGF ligando (AB011078.1) y se identificaron los exones presentes y con ello se identificaron las isoformas (xxx) correspondientes. Para los receptores de membrana y solubles cada fragmento que se encontró fue comparado contra el gen reportado en el GenBank de VEGFR1 (NM\_204252.1), sVEGFR1 (AB065373.1) y para VEGFR2 y su soluble (NM\_001004368.1).

## 8. Resultados

### 8.1. Productos de PCR punto final

Se demostró la presencia de ARNm para VEGF en células de la granulosa y teca de folículos F1 y F2 de gallina. En la Figura 1 se puede observar que el ARNm para VEGF (Figura 1, carril 1) se procesa para dar al menos 5 isoformas. Igualmente, se observa que las células de la granulosa y teca expresan ARNm para los receptores de membrana VEGFR1 y VEGFR2 y el dominio extracelular de los receptores en forma soluble sVEGFR1 y sVEGFR2 (Figura 1, carriles C3-C6). Las mismas isoformas para el ligando y los receptores fueron expresadas en el hígado del ave (Figura 2).

En las figuras 1 y 2 se muestran los productos de PCR en un gel de agarosa al 2% en el cual se puede ver que están presentes al menos cinco isoformas con distintos pesos moleculares. En el receptor VEGFR1 se logran apreciar 2 bandas, una que corresponde al amplicón para ese gen de 103 pb y otro de aproximadamente 200 pb que posteriormente se secuenciará para identificar si corresponde a una isoforma de este receptor, en cuanto a VEGFR2 y los receptores solubles sVEGFR1 y sVEGFR2, las bandas corresponden al tamaño de cada amplicón 102 pb, 129 pb y 79 pb respectivamente.

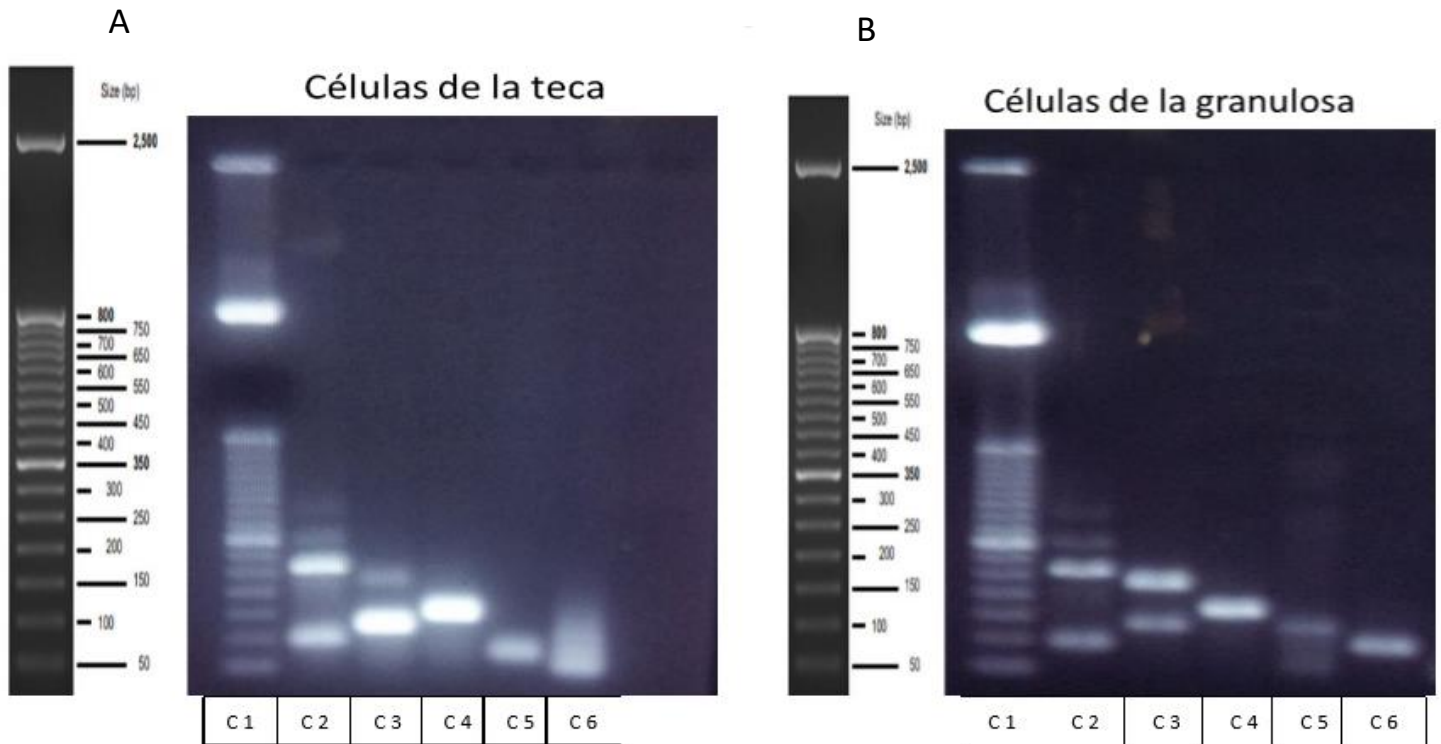


Figura 1. Gel de agarosa al 2%. Productos de PCR en células de la teca (A) y células de la granulosa(B) de pool de folículos jerárquicos F1 y F2. Carril 1= Marcador de Peso molecular (Trackit™ 50bp DNA Ladder, invitrogen), Carril 2= Isoformas de VEGF, Carril 3= VEGFR1, Carril 4= sVEGFR1, Carril 5= VEGFR2, Carril 6= sVEGFR2.

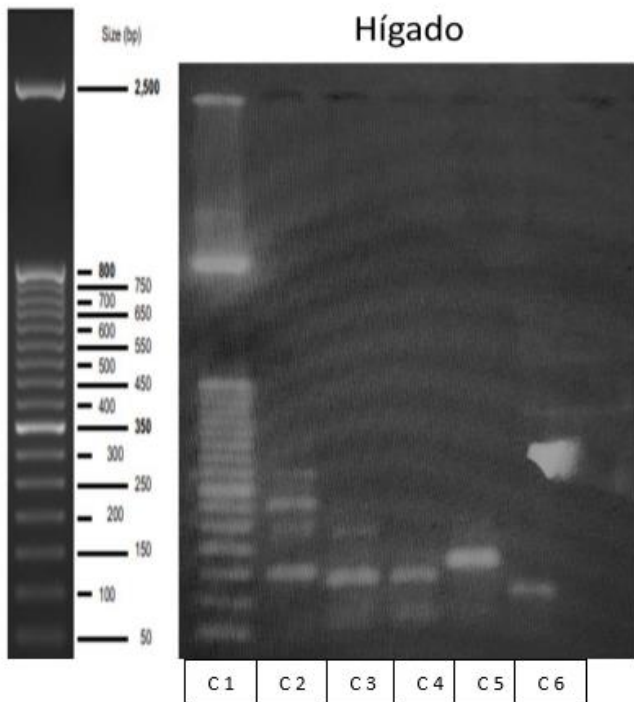


Figura 2. Gel de agarosa al 2%. Producto de PCR de hígado de gallina. Carril 1= Marcador de Peso molecular (Trackit™ 50bp DNA Ladder, invitrogen), Carril 2= Isoformas de VEGF, Carril 3= VEGFR1, Carril 4= VEGFR2, Carril 5= sVEGFR1, Carril 6= sVEGFR2

En la figura 3 se muestran los gels de agarosa utilizados para la extracción de las distintas bandas identificadas como las posibles isoformas de VEGF y las bandas que corresponden a cada gen de receptores de membrana y solubles de VEGF que corresponden con el amplicón de cada gen.

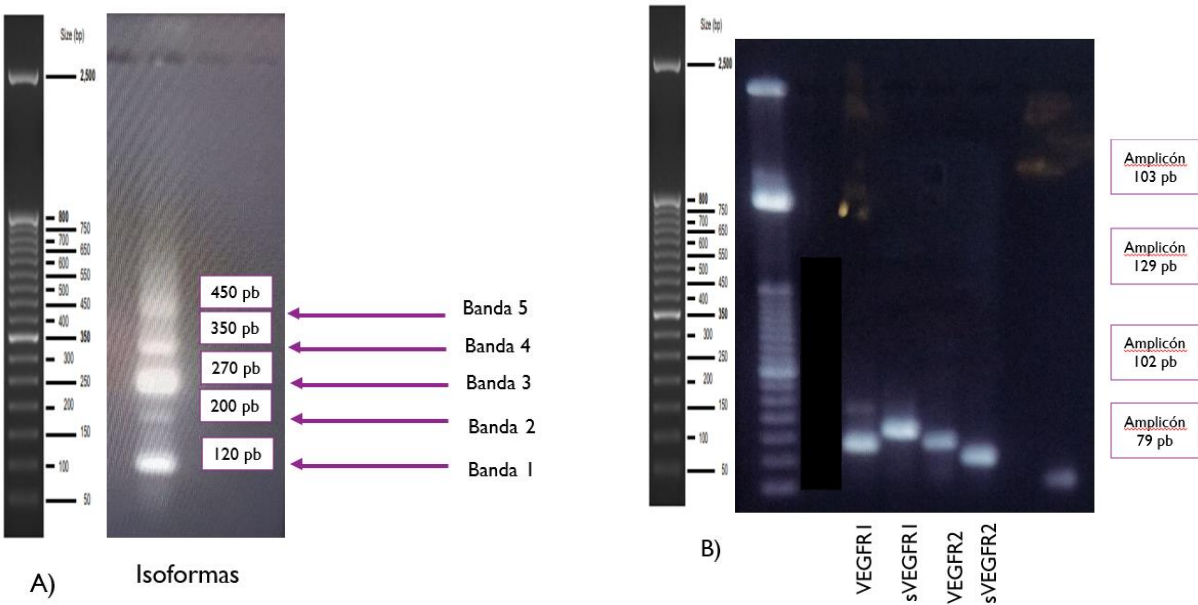


Figura 3. Identificación de las bandas en gel de agarosa para su posterior purificación. A) = Isoformas de VEGF. B) = receptores de VEGF.

## 8.2. Secuenciación

De las 5 bandas obtenidas (Figura 3 A) se secuenciaron 4 fragmentos, que, de acuerdo a los exones que contienen, corresponden a las isoformas VEGF122, VEGF146, VEGF166 y VEGF190 (Figura 4).



```

AB011078      301  tgtacaacgtcacgatggagatcgcaagaattaaaccccatcagagtcagcacatagcgc
VEGF Iso3.txt      1  -----tcagcacatagcgc
VEGF Iso2.txt      1  -----tcagcacatagcgc
VEGF Iso1C.txt     1  -----tcagcacatagcgc

AB011078      361  acatgagcttcttacagcacagtaaattgtgactgcagaccaaaagaaagatgtcaaaaata
VEGF Iso3.txt     15  acatgagcttcttacagcacagtaaattgtgactgcagaccaaaagaaagatgtcaaaaata
VEGF Iso2.txt     15  acatgagcttcttacagcacagtaaattgtgactgcagaccaaaagaaagatgtcaaaaata
VEGF Iso1C.txt    15  acatgagcttcttacagcacagtaaattgtgactgcagaccaaaagaaagatgtcaaaaata

AB011078      421  aacaagaaaaaaaatcaaagcgaggaaagggaagggtcaaaagagaaagcgcaagaaaag
VEGF Iso3.txt     75  aacaagaaaa-----
VEGF Iso2.txt     75  aacaagaaaagaaaatcaaagcgaggaaagggaagggtcaaaagagaaagcgcaagaaaag
VEGF Iso1C.txt    75  aacaagaaaa-----

AB011078      481  gccggtacaaaccaccagcttccactgtgagccttgctcagagaggagaaagcacttgt
VEGF Iso3.txt     85  -----ccactgtgagccttgctcagagaggagaaagcacttgt
VEGF Iso2.txt    135  gccggtacaaaccaccagctt-----
VEGF Iso1C.txt    -----

AB011078      541  ttgtacaagatccccagacctgtaaattgttccctgcaaatccacagactcacggttgaagt
VEGF Iso3.txt    123  ttgtacaagatccccagacctgtaaattgttccctgcaaatccacagactcacggttgaagt
VEGF Iso2.txt    -----
VEGF Iso1C.txt    -----

AB011078      601  cgaggcagcttgagttaaacgagcgcacttgcagatgtgaaaaaccgagacgggtgagcag
VEGF Iso3.txt    183  cgaggcagcttgagttaaacgagcgcacttgcagatgtgaaaaaccgagacgggtgagcag
VEGF Iso2.txt    157  -----atgtgaaaaaccgagacggtgagcag
VEGF Iso1C.txt    85  -----atgtgaaaaaccgagacgggtgagcag

AB011078      661  cggaaaaaagagggggaacagccctgtttctggagcctgatttctcgctggacag
VEGF Iso3.txt     243  cggaaaa-----
VEGF Iso2.txt     183  cggaaaa-----
VEGF Iso1C.txt    111  cggaaaa-----

```

Figura 4. Secuenciación de isoformas de VEGF donde se pueden observar las secuencias de 4 isoformas. AB011078 corresponde a la isoforma 190 (equivalente de la isoforma 189 en mamíferos con los exones 4,5,6,7 y 8), VEGF Iso 3 corresponde a la isoforma 166 (equivalente de la isoforma 165 en mamíferos con los exones 4,5,7 y 8), VEGF Iso 2 corresponde a la isoforma 146 (equivalente a la isoforma 145 en mamíferos con los exones 4,5,6 y 8) y VEGF Iso 1 que corresponde a la isoforma 122 (equivalente a la isoforma 121 en mamíferos con los exones 4, 5 y 8). Primer forward color rojo, exón 4 color naranja, exón 5 color morado, exón 6 color azul claro, exón 7 color azul oscuro, exón 8 color café y primer reverse color amarillo.

En cuanto a los receptores de membrana y sus correspondientes formas solubles, se comprobó que estas se expresaron en las células de la teca y de la granulosa de los folículos F1 y F2 de gallina. Se lograron secuenciar los fragmentos de ADNc correspondientes a VEGFR2, sVEGFR1 y sVEGFR2 obteniendo la siguiente secuencia:

```

NM_001004368      3543 gaggattcgggectctctctcccaacttcacctgcttctctgtaaggaggaagaggaagtc
KDR Con2.txt      1 -----aggaggaagaggaagtc
KDR Con1.txt      -----

NM_001004368      3603 tgtgatcctaattccattatgacaacacagcaggaattagtcagtagccgacaaggtagc
KDR Con2.txt      18 tgtgatcctaattccattatgacaacacagcaggaattagtcagtagccgacaaggtagc
KDR Con1.txt      -----

NM_001004368      3663 aaaaggaaaagtgcacctgtgagtggtgaaaacttttgaagatatccattggttaaccact
KDR Con2.txt      78 aaaaggaaaagccgacctgtgagtg-----
KDR Con1.txt      -----

```

Figura 5. Secuencia del gen de VEGF-R2 alineado con la secuencia publicada en el GenBank (NM\_001004368.1) identificado como KDR. El color rojo corresponde a la secuencia del primer forward, el color azul oscuro corresponde a la secuencia del exón 27, en color naranja el exón 28 y en color amarillo el primer reverse.

```

AB065373          2127 tcaggcacctatacctgccgagcaaggaaacatattcacggggaaagaagtgcttcaaaag
VEGFR 1 Con.txt  1 -----acctatacctgccgagcaaggaaacatattcacggggaaagaagtgcttcaaaag

AB065373          2187 aaagacgtttcaatcagacgtgagcactgcaacaaaaagctgtttactctcggatcctc
VEGFR 1 Con.txt  55 aaagacgtttcaatcagacgtgagcactgcaacaaaaagctgtttactctcggatcctc

AB065373          2247 aaatataagaacacaaggaatgattgtacaacacaaaagcaatgtaaaacattaa
VEGFR 1 Con.txt  115 aaatataagaacacaa-----

```

Figura 6. Secuencia del gen de sVEGF-R1 alineado con la secuencia publicada en el GenBank AB065373.1. El color rojo corresponde al primer forward, en color azul claro corresponde a la secuencia del exón 13, en color naranja corresponde al intrón 13 y en color amarillo corresponde al primer reverse.

Todas las secuencias se analizaron y se representan en el cuadro 2 en la cual se tiene la relación de los genes encontrados en las células foliculares de gallinas.

ID	Gen	Secuencia
<b>Isoformas</b>		
AB011078	VEGF190 (exón 4-5-6-7-8)	TCAGCACATAGCGCACATGA GCTTCTTACAGCACAGTAAATGTGACTGCAGACCAAAGAAAGATGTCAAAAATAACAAGAAAAAAATCAAAGCGAGGAAAGGGGAAGGGTCAAAGAGAAAGCGCAAGAAAGGCCGGTACAAACCACCCAGCTTCACTGTGAGCCTTGTCTCAGAGAGGAGAAAGCACTTGTGTACAAGATCCCAGACCTGTAATGTTCTGCAAATTCACAGACTCAGTTGCAAGTCGAGGCAGCTTGAGTTAAACGAGCGCACTTGCAATGTGAAAAACCGAGACGGTGAGCAGCGGAAAAGAAGGGGGAACAGCCCTGTTCTGGAGCCTGATTCTCGCCTGGACAG
VEGF Iso 3	VEGF166 (exón 4-5-7-8)	TCAGCACATAGCGCACATGA GCTTCTTACAGCACAGTAAATGTGACTGCAGACCAAAGAAAGATGTCAAAAATAACAAGAAAACTACTGTGAGCCTTGTCTCAGAGAGGAGAAAGCACTTGTGTACAAGATCCCAGACCTGTAATGTTCTGCAAATTCACAGACTCAGTTGCAAGTCGAGGCAGCTTGAGTTAAACGAGCGCACTTGCAATGTGAAAAACCGAGACGGTGAGCAGCGGAAAA
VEGF Iso 2	VEGF146 (exón 4-5-6-8)	TCAGCACATAGCGCACATGA GCTTCTTACAGCACAGTAAATGTGACTGCAGACCAAAGAAAGATGTCAAAAATAACAAGAAAGAAATCAAAGCGAGGAAAGGGGAAGGGTCAAAGAGAAAGCGCAAGAAAGGCCGGTACAAACCACCCAGCTTATGTGAAAAACCGAGACGGTGAGCAGCGGAAAA
VEGF Iso 1	VEGF122 (exón 4-5-8)	TCAGCACATAGCGCACATGA GCTTCTTACAGCACAGTAAATGTGACTGCAGACCAAAGAAAGATGTCAAAAATAACAAGAAAAATGTGAAAAACCGAGACGGTGAGCAGCGGAAA
<b>Receptores</b>		
VEGFR 1 Con	Receptor sVEGFR1 (exón 13 – intrón 13)	TCAGCACATAGCGCACATGA GGAACATATTCACGGGAAAGAGTGCTTCAAAAGAAAGACGTTTCAATCAGAGGTGAGCACTGCAACAAAAAGGCTGTTACTCTCGGATCTCA AATATAAGAACAACA
KDR Con 2	Receptor VEGFR2 (exón 27 – 28)	TCAGCACATAGCGCACATGA ATCCTAAATCCATTATGACAACACAGCAGGAATTAGTCAGTACCGACAAGGTAGCAAAAGGA AAGCCGACCTGTGAGTG
	Receptor sVEGFR2 (exón 13 – intrón 13)	TCAGCACATAGCGCACATGA ACACAGCACTGCCTGGTGAAGCACCTCACTGTTCAAGGTATGGATCTCTGCCGTGAGAA

Tabla 2. Se muestra la secuencia de los genes encontrados en células de la granulosa y teca de folículos F1 y F2 de gallinas. En la se secuencia se encuentra marcado con color verde el primer forward y en color amarillo el primer reverse. Las letras color rosa corresponde a la secuencia del exón 4, el color café corresponde al exón 5, azul exón 6, verde exón 7 y rojas exón 8.

## 9. Discusión

En este trabajo se demuestra la expresión del ARNm de las isoformas de VEGF190 (exón 1-2-3-4-5-6a completo-7-8), VEGF166 (exón 1-2-3-4-5-7-8), VEGF146 (1-2-3-4-5-6-8), y VEGF122 (exón 1-2-3-4-5-8), así como de los receptores de membrana VEGFR1, VEGFR2 y sus formas solubles sVEGFR1 y sVEGFR2 en células de la granulosa y células de la teca de folículos jerárquicos F1 y F2 de gallinas. En los geles con los productos de PCR de VEGF, realmente pudimos distinguir 5 isoformas, una más de las que se mencionan arriba, que, de acuerdo al número de bases aproximado, corresponde a la isoforma 207, sin embargo, ésta aún no ha sido secuenciada. Este es el primer reporte de la presencia de isoformas de VEGF y del receptor soluble sVEGFR2 en los folículos de las gallinas. De la misma manera, es la primera vez que se presenta la secuencia de bases para cada uno de estos componentes del sistema VEGF (ligandos y receptores).

Distintos autores han demostrado la expresión de ARNm de isoformas de VEGF en folículos de mamíferos, incluyendo a los humanos. En humanos se han descrito siete isoformas de VEGF: VEGF 121 (exón 1-2-3-4-5-8), VEGF 145 (exón 1-2-3-4-5-6-8), VEGF 148 (exón 1-2-3-4-5-7a-8), VEGF 165 (exón 1-2-3-4-5-7-8), VEGF 183 (exón 1-2-3-4-5-6a la mitad-7-8), VEGF 189 (exón 1-2-3-4-5-6a completo-7-8) y VEGF 206 (exón 1-2-3-4-5-6-7-8) (Peach *et al.*, 2018). Los homólogos de estas proteínas en animales, contienen un aminoácido menos (Ferrara *et al.*, 2003). Adicionalmente, en mamíferos existen isoformas de VEGF que desempeñan funciones angiogénicas y otras con actividad anti angiogénica. Esta diferencia funcional de las isoformas de VEGF, depende del sitio de corte y empalme en el exón 8. Si dicho corte y empalme ocurre en la parte proximal del exón 8 u 8a, se dará lugar a isoformas angiogénicas, mientras que si el corte y empalme sucede en el sitio distal u 8b se producirán isoformas anti angiogénicas (Ferrara, 2004). Es importante señalar que el análisis de la secuencia del gen de la gallina, parece no contener el exón 8b (Fierro, comunicación personal). Esto es relevante en el contexto de este estudio, ya que al no existir las isoformas anti angiogénicas de VEGF, muy probablemente la acción biológica de VEGF, ocurre a través de la regulación en la expresión de los receptores de membrana y de sus formas solubles.

Las isoformas VEGF122, VEGF146, VEGF165 y VEGF190 han sido expresadas durante el desarrollo embrionario de pollos (Baum *et al.*, 2010; Yamaguchi *et al.*, 2002) y codornices (Flamme *et al.*, 1995). En 1995, Flamme y colaboradores, reportaron la expresión de estas cuatro isoformas (VEGF122, VEGF145, VEGF166 y VEGF190) durante la diferenciación del corazón, riñón, hígado y cerebro en el embrión de codorniz. Estas isoformas mostraban una homología del 80.4% con las isoformas VEGF189, 165, 145 y 121 reportadas en ratones.

Nosotros estamos reportando la expresión del ARNm de las isoformas VEGF 122, VEGF146, VEGF 166, VEGF 190 y VEGF207 en células de folículos ováricos jerárquicos F1 y F2 de la gallina, las cuatro primeras coinciden con las que otros autores han reportado en tejidos embrionarios de codorniz (Flamme *et al.*, 1995) y pollo (Baum *et al.*, 2010). Adicionalmente, nosotros observamos la presencia de la isoforma VEGF207 y a reserva de realizar su secuenciación para confirmar que se

trata de esta isoforma, en el gel de los productos de PCR, se muestra la evidencia de la presencia de esta isoforma en los folículos de las gallinas. Cabe señalar como ya dijimos que en este trabajo en el gel de agarosa con los productos de PCR, identificamos cinco isoformas de VEGF que, de acuerdo al marcador del número de bases, corresponden a VEGF 122 (120 pb) VEGF146 (200 pb), VEGF 165 (270 pb), VEGF190 (350pb) y VEGF207 (450 pb). Estas isoformas son homólogas a VEGF121, VEGF145, VEGF 165, VEGF189 y VEGF206 descritas en humanos (Robinson *et al.*, 2001) y a VEGF120, VEGF 144, VEGF164, VEGF188 y VEGF205 descritas en ratones (Ng, *et al.*, 2000).

Los distintos exones que tiene presentes cada isoforma tienen propiedades que las hace diferentes biológicamente. Los exones 1 a 5 y 8 son exones constitutivos presentes en todas las isoformas (Wellmann *et al.*, 2001), el exón 1 y 2 codifican una secuencia señal, un sitio de glicosilación, un sitio de unión a VEGFR1 y VEGFR2, mientras que los exones 6 y 7 codifican los dominios de unión a heparina que determinan la unión a la matriz extracelular (Ferrara *et al.*, 2003).

En varias especies se ha reportado que VEGF es un factor importante durante la angiogénesis folicular , se ha visto que los folículos que llegan a la dominancia presentan una red vascular extensa la cual provee a los folículos del aporte necesario de oxígeno, hormonas y nutrientes necesarios para continuar su crecimiento (Rosales *et al.*, 2010). La presencia de VEGF se encuentra en células de la granulosa, células de la teca y células lúteas de bovinos (Berisha *et al.*,2000), cerdos (Barboni *et al.*, 2000), primates (Stouffer *et al.*, 2001), ratones (Marconi *et al.*, 2007) y humanos (Tapia *et al.*, 2006). Las isoformas de VEGF se encuentran presentes en diferentes especies de mamíferos, las isoformas VEGF120, VEGF164 y VEGF205 se han visto expresadas en células de la granulosa y teca de folículos sanos y atrésicos en ovejas y su presencia está relacionada con la salud del folículo, la expresión de ARNm de VEGF 120 y VEGF 164 disminuyó en folículos con atresia mientras que la isoforma VEGF 205, no fue detectada en células de la granulosa bajo esta condición. En células de la granulosa cultivadas de bovino se demostró el efecto de progesterona sobre la expresión de las isoformas de VEGF 120 y VEGF 164, se reporta que ARNm de

VEGF120 aumentó significativamente con la adición de progesterona a los cultivos, por el contrario, la expresión de VEGF 164 fue inhibida en esta hormona, este estudio sugiere que la expresión de estas isoformas de VEGF en las células de la granulosa puede estar controlada por el ambiente hormonal durante el desarrollo folicular en bovinos (Shimizu *et al.*, 2007).

Las isoformas más abundantes en la mayoría de las especies incluyendo bovinos y cerdos son VEGF164 y VEGF120, mientras que la isoforma 188 está presente en folículos de bovinos (Shimizu *et al.*, 2006) pero no en cerdos (López *et al.*, 2017). Aunque en este estudio no podemos hablar de abundancia, si podemos decir que la isoforma VEGF190, equivalente a la VEGF 188 en mamíferos, está presente tanto en células de la granulosa como células de la teca de folículos jerárquicos de gallinas. En el presente estudio se ven expresadas las distintas isoformas angiogénicas de VEGF en ambas células foliculares correspondiendo a la etapa del desarrollo en aves donde el folículo no puede sufrir atresia, por lo que se debe conservar sano hasta el momento de la ovulación. La ausencia de atresia en folículos jerárquicos de gallina se debe al ambiente hormonal que generan especialmente la producción de progesterona, en esta etapa, induce la sobrevivencia de las células de la granulosa, por otra parte la FSH también controla mecanismos de sobrevivencia independientes a la progesterona (Rangel *et al.*, 2006).

En un estudio realizado en 2003 por Finkelstein y colaboradores mediante RT-PCR demostraron la expresión de ARNm de cuatro isoformas de VEGF, VEGF122, VEGF146, VEGF166 y VEGF190 en diferentes tejidos de la codorniz, indican que su expresión es similar durante el desarrollo embrionario y no existen cambios significativos en la expresión de estas. En nuestro trabajo, podemos ver que las cinco isoformas que detectamos, se expresan en las dos células foliculares, así como en el hígado que se usó como tejido control o de referencia y aunque en los geles se observan con mayor claridad las isoformas en células de la teca, que en las otras células (granulosa e hígado) no podemos hablar de abundancias porque no usamos un método cuantitativo. Baum y colaboradores en el 2010 reportaron que las isoformas más expresadas durante el desarrollo embrionario son VEGF166 y VEGF 120, por lo

cual sugieren que estas actúan de manera dual durante el desarrollo embrionario de los tejidos. En codorniz se ha visto que la presencia de VEGF 166 es indispensable para la formación de vasos grandes en el desarrollo del corazón (Yue *et al.*, 2001). Stalmans y colaboradores (2002), mostraron con ratones knockout que VEGF 164 regula la remodelación de las arterias mientras que VEGF 120 controla el patrón de expresión del sistema capilar de la retina, esto parece indicar que VEGF 164 y 120 están relacionados con la formación de capilares y venas en conjunto.

La isoforma VEGF 165, fue la primera isoforma caracterizada y continúa siendo la más investigada en cuanto a su función, señalización, expresión y principalmente al papel que desempeña en la presencia de patologías. Es considerada la isoforma más abundante y biológicamente activa en humanos (Abir *et al.*, 2010), bovinos (Berisha *et al.*, 2000), cerdos (Barboni *et al.*, 2000) y ovejas (Rosales *et al.*, 2010). Sus efectos, además de angiogénesis están relacionados con la inducción en proliferación de células como las espermatogonias (Caires *et al.*, 2012) y junto a VEGF 120 en células de cáncer de mama (Liang *et al.*, 2006) y en células de la granulosa (Greenaway *et al.*, 2004) Durante un experimento para demostrar que VEGF es importante durante la transición de folículos primarios a secundarios se han encontrado la presencia de las isoformas VEGF 121, 164 y 188 presentes en células de la granulosa y teca de folículos secundarios de bovino mediante inmunohistoquímica y existe un aumento de VEGF a medida que avanza el desarrollo folicular (Yang *et al.*, 2007). En el presente trabajo se utilizaron folículos jerárquicos los cuales ya tiene un desarrollo avanzado y de igual manera se muestra la presencia de VEGF 122, VEGF146, VEGF166 VEGF190 y VEGF205. Araújo y colaboradores en 2011 evaluaron el efecto de VEGF 165 sobre el desarrollo *in vitro* de folículos preantrales secundarios de cabra los resultados demostraron que la adición de VEGF 165 al medio de cultivo mejoró el desarrollo de los folículos preantrales, permitiendo la producción de ovocitos maduros. De acuerdo a que en distintas especies se ha visto que la presencia de VEGF165 es importante durante el desarrollo folicular de mamíferos y por los resultados obtenidos en este trabajo podemos decir que VEGF166 también juega un papel importante en los folículos jerárquicos F1 y F2 de gallina.

En cuanto a los receptores de membrana para VEGF, el primer reporte en aves se hizo mediante Northern blot y fue del receptor VEGFR2 (Flk-1), el cual está presente durante el desarrollo embrionario de codorniz y se expresa en mesodermo, endodermo y ectodermo y su expresión está restringida a células endoteliales. En el día 10 de embriogénesis se vio expresado también en células endoteliales de pulmón y endocardio (Flamme *et al.*, 1995). En este estudio reportamos la presencia del ARNm de VEGFR-2 (Flk-1) en células de la granulosa y células de la teca de folículos jerárquicos F1 y F2 de gallina, el cual está compuesto por 30 exones igual que en otras especies (Ferrara *et al.*, 2003). En nuestro estudio, los primers para este receptor se diseñaron en el exón 27 y 28 para asegurarnos que se trataba de la forma completa de este receptor, al realizar la secuenciación, se comprobó que efectivamente corresponde a la secuencia VEGFR2 reportada GenBank NM\_001004368.1. De acuerdo a lo que pudimos ver en el gel con los productos de PCR, por la intensidad y grueso de la banda, parece que hay ligeramente mayor expresión de VEGFR2 en células de la teca que en la granulosa, probablemente porque en la teca hay también células endoteliales y vasos sanguíneos, sin embargo, se requieren estudios cuantitativos para confirmar esta información. A diferencia de lo que nosotros reportamos aquí, Kim y colaboradores (2016) precisamente por la suposición del aumento creciente de células endoteliales y vasos sanguíneos durante el crecimiento folicular, esperaba encontrar una mayor expresión de ARNm de VEGFR1 y VEGFR2 en teca de folículos de gallina en la medida que el folículo se acerca a la ovulación, sin embargo, ellos no vieron diferencia en la expresión de ninguno de estos receptores entre folículos pre seleccionados (6-8 mm), recientemente seleccionados (9-12 mm) y los preovulatorios (F2-F4) y, en células de la granulosa, no observaron niveles detectables de ARNm en ninguno de los tamaños foliculares. En este mismo trabajo los autores identificaron la expresión de ARNm de ambos receptores en tejido (células de la granulosa más teca) de folículos de 3-5 mm sanos y atrésicos y la mayor expresión del ARNm de ambos receptores ocurrió en folículos sanos, relacionado con la mayor expresión también del ARNm del ligando VEGF en estos folículos.

La presencia de VEGFR2 a nivel ovárico en otras especies como bovinos, ratones y humanos también ha sido relacionado con la salud del folículo, asociada con la



proliferación, migración, supervivencia y permeabilidad vascular de células endoteliales (Ferrara *et al.*, 2003) que finalmente promueven la angiogénesis (Peach *et al.*, 2018), así como por mediar los efector citoprotectores (Greenaway *et al.*, 2004) y proliferativos de las células foliculares (Kosaka *et al.*, 2007). Es probable entonces que la expresión del ARNm de VEGFR1 y VEGFR2 en células de la granulosa y teca de los folículos F1 y F2 en este estudio sean importantes integrantes del complejo de moléculas que llevan a los folículos a la jerarquía.

En un estudio realizado por Greenaway y colaboradores (2004) demostraron la participación de VEGF y su receptor VEGFR1 en la supervivencia de células foliculares de bovinos y roedores. El VEGFR-1 se expresa en células endoteliales y células no endoteliales, incluidas células madre hematopoyéticas, macrófagos y monocitos (Park *et al.*, 2018). En el presente estudio, de acuerdo a lo observado en los geles donde se corrieron los productos de PCR, aparentemente ambos receptores están más expresados en células de la teca que en la granulosa, lo cual puede deberse a la contribución que hacen en la expresión de estos receptores las células vasculares en la capa de la teca.

Sachiko y colaboradores en 2002, observaron la presencia de sVEGFR1 obtenido de ADN genómico de pollos por medio de hibridación Southern blot y reportan que este gen tiene una homología de 80% con el de humanos. En el presente estudio se demostró la expresión de ARNm de sVEGFR1 en células de la teca y granulosa de folículos jerárquicos F1 y F2 de gallina. El sVEGFR1, igual que su homólogo de membrana VEGFR1, tiene una gran afinidad por VEGF por lo que al estar presente impide la interacción de VEGF con los receptores de membrana con lo cual se impiden los efectos biológicos del ligando (Maynard *et al.*, 2003). Estudios *in vivo* han demostrado que el sVEGFR-1 es un señuelo que reduce la biodisponibilidad del VEGF para evitar el crecimiento excesivo de células endoteliales en el lumen del vaso (Duglas *et al.*, 2005). En animales y en particular en aves se sabe muy poco de la función que desempeñan los receptores solubles para VEGF, sin embargo, es muy probable que en las gallinas donde no se han identificado y donde aparentemente por la estructura de gen de VEGF, no cabe la posibilidad de expresión de isoformas anti

angiogénicas, es muy probable que sVEGFR1 y sVEGFR2 puedan estar actuando como reguladores negativos de todas las isoformas de VEGF. La demostración de la presencia del ARNm y la secuenciación respectiva, abre un importante campo de estudio sobre la regulación del sistema VEGF en las gallinas y en especial el papel que juegan todos los componentes de este sistema en el desarrollo folicular de esta especie.

Este es el primer reporte de la expresión de ARNm de sVEGFR2, en células de la granulosa como en células de la teca de folículos jerárquicos F1 y F2 de gallina. En un estudio realizado por Macias y colaboradores en 2012 se mostró la expresión de ARNm de sVEGFR1 y sVEGFR2 en células de folículos dominantes de bovinos, ellos reportan que la presencia de sVEGFR1 disminuyó en el folículo dominante del día 9 del ciclo estral, mientras que sVEGFR2 aumentó su expresión, lo cual significa que en la pérdida de la dominancia, el corte y empalme de VEGFR2 y la producción de su forma soluble es un importante evento para limitar la biodisponibilidad del ligando y provocar la atresia del folículo dominante. Sin embargo, en los folículos F1 y F2 de las gallinas, donde los folículos ya no pueden sufrir atresia, es probable que sVEGFR1 y sVEGFR2 estén involucrados en el control de crecimiento y desarrollo del folículo y, de manera muy especial en el control de la angiogénesis del folículo que se acerca a la ovulación, porque de no existir este control, la ovulación podría representar un riesgo de hemorragia en el ovario y poner en peligro la vida del animal.

En bovinos se ha detectado la mayor presencia del ARNm de sVEGF1 y sVEGF2 en folículos preseleccionados en comparación con los post seleccionados dominantes. Esto indica que la disminución de estos receptores en folículos dominantes favorece que el ligando se una a los receptores de membrana y el folículo se pueda mantener sano debido a los efectos de VEGF (Ortega *et al.*, 2016), sin embargo en la medida que un folículo se acerca a la ovulación, tendrá que buscar la manera de evitar una vascularidad descontrolada con formación excesiva de redes vasculares, para que ocurra la ovulación sin riesgo de hemorragia.

Es claro que en todos los sistemas biológicos debe existir un equilibrio entre sus partes o integrantes, el sistema VEGF, no es la excepción, este sistema está integrado por

promotores e inhibidores de la acción biológica de VEGF. En este trabajo pudimos demostrar la presencia de cinco isoformas del ligando de VEGF, dos receptores de membrana (VEGFR1 y VEGFR2) y sus correspondientes formas solubles (sVEGFR1 y sVEGFR2), esto proporciona información valiosa que puede ser usada en futuras investigaciones para comprender cada vez mejor la biología reproductiva de las gallinas.

#### 10. Conclusiones

- Las células de la granulosa y la teca de las gallinas expresan cinco isoformas de VEGF.
- Por el análisis de secuenciación, se identificaron en granulosa y teca de folículos F1 y F2 de las gallinas, las isoformas VEGF190 (exón 1-2-3-4-5-6a completo-7-8), VEGF166 (exón 1-2-3-4-5-7-8), VEGF146 (1-2-3-4-5-6-8), VEGF122 (exón 1-2-3-4-5-8) y una quinta isoforma que aún no se ha secuenciado pero que de acuerdo al número de bases que contiene el amplicón producto de la PCR, parece que se trata de la isoforma VEGF207 (exón 1-2-3-4-5-6a-6b-7-8).
- De acuerdo a la imagen de los geles con los productos de PCR, las cinco isoformas identificadas en gallinas, son más abundantes en la teca que en las células de la granulosa y las bandas más intensas, lo cual indica mayor abundancia, fueron para las isoformas VEGF122 y VEGF166.
- En células de la granulosa y teca de los folículos de gallina, se expresan los ARNm de los receptores de membrana VEGFR1 y VEGFR2, así como las respectivas formas solubles sVEGFR1 y sVEGFR2.
- La posición en los exones 27-28 de los primers diseñados para identificar los receptores de membrana y la secuenciación realizada permitieron corroborar que los receptores de membrana contienen los exones intra citoplasmáticos similar a los de otros mamíferos y en el caso de las formas solubles, las secuencias se cortan en el exón-intrón 13, también de manera similar al de otros animales de producción.

- La expresión simultánea del ARNm de los ligandos y receptores de VEGF en la teca indica la acción autocrina y parácrina (sobre células endoteliales) que puede tener este factor de crecimiento.
- La presencia de ARNm para las isoformas de VEGF y los receptores de membrana y solubles en células de la granulosa indica que este sistema está presente en células no endoteliales, igual que en otros animales.
- Si es verdad la ausencia de isoformas VEGF<sub>xxx</sub>b en las aves, es muy probable que la relación de VEGFR/sVEGFR juegue un papel fundamental en la regulación del sistema VEGF

## 11. Referencias

- Abir, R., Ao, A., Zhang, X. Y., Garor, R., Nitke, S., & Fisch, B. (n.d.). Vascular endothelial growth factor A and its two receptors in human preantral follicles from fetuses, girls, and women. *Fertility and Sterility*, *93*, 2337–2347.
- Ahmad, S., Hewett, P. W., Al-Ani, B., Sissaoui, S., Fujisawa, T., Cudmore, M. J., & Ahmed, A. (2011). Autocrine activity of soluble Flt-1 controls endothelial cell function and angiogenesis. *Vascular Cell*, *3*(1), 15. <https://doi.org/10.1186/2045-824X-3-15>
- Alam, H., Weck, J., Maizels, E., Park, Y., Lee, E. J., Ashcroft, M., & Hunzicker-Dunn, M. (2009). Role of the PI3-kinase and ERK pathways in the induction of HIF-1 activity and the HIF-1 target VEGF in ovarian granulosa cells in response to follicle stimulating hormone. *Endocrinology*, *150*, 915–928.
- Amory, J. K., Anawalt, B. D., Matsumoto, A. M., Page, S. T., Bremner, W. J., Wang, C., ... Clark, R. V. (2008). The effect of 5alpha-reductase inhibition with dutasteride and finasteride on bone mineral density, serum lipoproteins, hemoglobin, prostate specific antigen and sexual function in healthy young men. *The Journal of Urology*, *179*(6), 2333–2338. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2008.01.145>
- Araújo, V. R., Silva, G. M., Duarte, A. B. G., Magalhães, D. M., Almeida, A. P., Gonçalves, R. F. B., ... Figueiredo, J. R. (2011). Vascular endothelial growth factor-A165 (VEGF-A165) stimulates the in vitro development and oocyte competence of goat preantral follicles. *Cell and Tissue Research*, *346*(2), 273–281. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1251-1>
- Baijun, K., Yulin, L., Lihong, Z., Guibin, Z., Xinrui, W., Yilei, L., ... Yingai, S. (2004). *In vivo inhibition of tumor angiogenesis by a soluble VEGFR-2 fragment*. *76*, 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2003.10.010>
- Barboni, B., Turriani, M., Galeati, G., Spinaci, M., Bacci, M. L., Forni, M., & Mattioli, M. (2000). Vascular Endothelial Growth Factor Production in Growing Pig Antral Follicles1. *Biology of Reproduction*, *63*(3), 858–864. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.3.858>
- BAUM, O., SUTER, F., GERBER, B., TSCHANZ, S. A., BUERGY, R., BLANK, F., ... DJONOV, V. (2010). VEGF-A Promotes Intussusceptive Angiogenesis in the Developing Chicken Chorioallantoic Membrane. *Microcirculation*, *17*(6), 447–457. <https://doi.org/10.1111/j.1549-8719.2010.00043.x>
- Berisha, B., Schams, D., Kosmann, M., Amselgruber, W., & Einspanier, R. (2000). Expression and localisation of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. *Journal of Endocrinology*, *167*(3), 371–382. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1670371>
- Black, D. L. (2003). Mechanisms of Alternative Pre-Messenger RNA Splicing. *Annual Review of Biochemistry*, *72*(1), 291–336. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161720>

- Bulfinch, M. (2009). ( *Temminck , 1813* ) ( *Aves : Columbidae* ) en Córdoba , Argentina. 16(1), 61–66.
- Caires, K. C., de Avila, J. M., Cupp, A. S., & McLean, D. J. (2012). VEGFA Family Isoforms Regulate Spermatogonial Stem Cell Homeostasis in Vivo. *Endocrinology*, 153(2), 887–900. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1323>
- Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 438(7070), 932–936.
- Catherine Sánchez, N. (2013). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 24(4), 553–562. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(13\)70659-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0716-8640(13)70659-X)
- Clinico, H., & Universidad, D. E. L. a. (2006). *Departamento de Endocrinología “ROL DEL FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO ( NGF ) EN LA REGULACION DE LA PROLIFERACION Y ANGIOGENESIS DEL OVARIO .”*
- Cui, T.-G., Foster, R. R., Saleem, M., Mathieson, P. W., Gillatt, D. A., Bates, D. O., & Harper, S. J. (2004). Differentiated human podocytes endogenously express an inhibitory isoform of vascular endothelial growth factor (VEGF165b) mRNA and protein. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 286(4), F767–F773.
- DE ALMEIDA, M. A. M. (2015). *AVALIAÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF) E MACRÓFAGOS ASSOCIADOS AO TUMOR (TAM) EM CARCINOMAS MAMÁRIOS DE CADELAS.*
- Dejana, E. (2004). Endothelial cell–cell junctions: happy together. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(4), 261–270. <https://doi.org/10.1038/nrm1357>
- Dejana, E., Orsenigo, F., & Lampugnani, M. G. (2008). The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *Journal of Cell Science*, 121(13), 2115 LP – 2122. <https://doi.org/10.1242/jcs.017897>
- Dvm, S. E. M. (n.d.). *Kuşlarda Genital Anatomy.Pdf.*
- Dvorak, H F. (2005). *Angiogenesis : update 2005.* 1835–1842.
- Dvorak, Harold F. (2005). Angiogenesis: Update 2005. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3(8), 1835–1842. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01361.x>
- Ebos, J. M., Bocci, G., Man, S., Thorpe, P. E., Hicklin, D. J., Zhou, D., ... Kerbel, R. S. (2004). A naturally occurring soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 2 detected in mouse and human plasma. *Molecular Cancer Research : MCR*, 2(6), 315–326. <https://doi.org/2/6/315> [pii]
- Elias, A. P., & Dias, S. (2008). *Microenvironment Changes ( in pH ) Affect VEGF Alternative Splicing.* 131–139. <https://doi.org/10.1007/s12307-008-0013-4>
- Farzaneh Behelgard, M., Zahri, S., Gholami Shahvir, Z., Mashayekhi, F., Mirzanejad, L., & Asghari, S. M. (2020). Targeting signaling pathways of VEGFR1 and VEGFR2 as a potential target in the treatment of breast cancer. *Molecular*

- Biology Reports*, 47(3), 2061–2071. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05306-9>
- Ferrara, N. (2002). VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nature Reviews Cancer*, 2(10), 795–803. <https://doi.org/10.1038/nrc909>
- Ferrara, N. (2004). Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. *Endocrine Reviews*, 25(4), 581–611. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1210/er.2003-0027>
- Ferrara, N., & Davis-Smyth, T. (1997). The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor. *Endocrine Reviews*, 18(1), 4–25. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1210/edrv.18.1.0287>
- Ferrara, N., Gerber, H.-P., & LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*, 9, 669. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nm0603-669>
- Ferrara, N., & Henzel, W. J. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 161(2), 851–858. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-291X\(89\)92678-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-291X(89)92678-8)
- Finkelstein, E. B., & Poole, T. J. (2003). Expression of vascular endothelial growth factor isoforms in the Japanese quail embryo. *Growth Factors*, 21(1), 41–49. <https://doi.org/10.1080/0897719031000107809>
- Flamme, I., Breier, G., & Risau, W. (1995). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor 2 (flk-1) are expressed during vasculogenesis and vascular differentiation in the quail embryo. *Developmental Biology*, Vol. 169, pp. 699–712. <https://doi.org/10.1006/dbio.1995.1180>
- Forstreuter, F., Lucius, R., & Mentlein, R. (2002). Vascular endothelial growth factor induces chemotaxis and proliferation of microglial cells. *Journal of Neuroimmunology*, 132(1), 93–98. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(02\)00315-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0165-5728(02)00315-6)
- Foxton, R. H., Finkelstein, A., Vijay, S., Dahlmann-Noor, A., Khaw, P. T., Morgan, J. E., ... Ng, Y.-S. (2013). VEGF-A is necessary and sufficient for retinal neuroprotection in models of experimental glaucoma. *The American Journal of Pathology*, 182(4), 1379–1390.
- Fraser, H. M., Wilson, H., Morris, K. D., Swanston, I., & Wiegand, S. J. (2005). Vascular Endothelial Growth Factor Trap Suppresses Ovarian Function at All Stages of the Luteal Phase in the Macaque. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(10), 5811–5818. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-1199>
- Fraser, H. M., & Wulff, C. (2002). Angiogenesis in the primate ovary. *Reproduction, Fertility and Development*, 13(8), 557–566. Retrieved from <https://doi.org/10.1071/RD01055>
- Froger, N., Matonti, F., Roubex, C., Forster, V., Ivkovic, I., Brunel, N., ... Picaud, S.

- (2020). VEGF is an autocrine/paracrine neuroprotective factor for injured retinal ganglion neurons. *Scientific Reports*, 10(1), 1–11.
- Gallo, P. R., Reprodutor, A., & Gallina, D. E. L. A. (2017). *Universidad Nacional "Pedro Ruiz Gallo."*
- Gerber, H.-P., Vu, T. H., Ryan, A. M., Kowalski, J., Werb, Z., & Ferrara, N. (1999). VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nature Medicine*, 5(6), 623–628. <https://doi.org/10.1038/9467>
- Gille, H., Kowalski, J., Li, B., LeCouter, J., Moffat, B., Zioncheck, T. F., ... Ferrara, N. (2001). Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2): A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *Journal of Biological Chemistry*, 276(5), 3222–3230. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002016200>
- Goel, H. L., & Mercurio, A. M. (2013). VEGF targets the tumour cell. *Nature Reviews Cancer*, 13(12), 871–882. <https://doi.org/10.1038/nrc3627>
- Greenaway, J., Connor, K., Pedersen, H. G., Coomber, B. L., LaMarre, J., & Petrik, J. (2004). Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptor, Flk-1/KDR, Are Cytoprotective in the Extravascular Compartment of the Ovarian Follicle. *Endocrinology*, 145(6), 2896–2905. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1210/en.2003-1620>
- Greenaway, J., Gentry, P. A., Feige, J.-J., LaMarre, J., & Petrik, J. J. (2005). Thrombospondin and Vascular Endothelial Growth Factor Are Cyclically Expressed in an Inverse Pattern During Bovine Ovarian Follicle Development<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*, 72(5), 1071–1078. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.031120>
- Guzmán, A., Macías-Valencia, R., Fierro-Fierro, F., Gutiérrez, C. G., & Rosales-Torres, A. M. (2015). The corpora lutea proangiogenic state of VEGF system components is turned to antiangiogenic at the later phase of the oestrous cycle in cows. *Animal*, 9(2), 301–307. <https://doi.org/DOI: 10.1017/S1751731114002274>
- Henriksen, K., Karsdal, M., Delaissé, J.-M., & Engsig, M. T. (2003). RANKL and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Induce Osteoclast Chemotaxis through an ERK1/2-dependent Mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 278(49), 48745–48753. <https://doi.org/10.1074/JBC.M309193200>
- Her, J., Ray, C., Altshuler, J., Zheng, H., & Bunting, S. F. (2018). 53BP1 Mediates ATR-Chk1 Signaling and Protects Replication Forks under Conditions of Replication Stress. *Molecular and Cellular Biology*, 38(8), e00472-17. <https://doi.org/10.1128/MCB.00472-17>
- Holmes, D. I. R., & Zachary, I. (2005). The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. *Genome Biology*, 6(2), 209. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-2-209>



- Hornig, C., & Weich, H. A. (1999). Soluble VEGF receptors: Recombinant and naturally occurring forms involved in the regulation of angiogenesis. *Angiogenesis*, 3(1), 33–39. <https://doi.org/10.1023/A:1009033017809>
- Houck, K. A., Ferrara, N., Winer, J., Cachianes, G., Li, B., & Leung, D. W. (1991). The Vascular Endothelial Growth Factor Family: Identification of a Fourth Molecular Species and Characterization of Alternative Splicing of RNA. *Molecular Endocrinology*, 5(12), 1806–1814. <https://doi.org/10.1210/mend-5-12-1806>
- Ioannidou, S., Deinhardt, K., Miotla, J., Bradley, J., Cheung, E., Samuelsson, S., ... Shima, D. T. (2006). An *in vitro* assay reveals a role for the diaphragm protein PV-1 in endothelial fenestra morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(45), 16770 LP – 16775. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603501103>
- Irusta, G., Abramovich, D., Parborell, F., & Tesone, M. (2010). Direct survival role of vascular endothelial growth factor (VEGF) on rat ovarian follicular cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 325(1), 93–100. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.04.018>
- Jain, R. K. (2005). Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*, 307(5706), 58–62.
- Johnson, A L, & Bridgham, J. T. (2000). Caspase-3 and -6 Expression and Enzyme Activity in Hen Granulosa Cells1. *Biology of Reproduction*, 62(3), 589–598. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod62.3.589>
- Johnson, Alan L. (2015). *Chapter 28 - Reproduction in the Female* (C. G. B. T.-S. A. P. (Sixth E. Scanes, Ed.)). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407160-5.00028-2>
- Johnson, P. A. (2012). Follicle Selection in the Avian Ovary. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(s4), 283–287. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02087.x>
- Khuda, G., SDouglas, D., Naauer, M., Rc, Z., Douglas, N. C., Nakhuda, G. S., ... Zimmermann, R. C. (2005). Angiogenesis and Ovarian Function. *J Fertil Reprod*, 13(4), 7–15.
- Kim, D., Lee, J., & Johnson, A. L. (2016). Vascular endothelial growth factor and angiopoietins during hen ovarian follicle development. *General and Comparative Endocrinology*, 232, 25–31. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.11.017>
- Kosaka, N., Sudo, N., Miyamoto, A., & Shimizu, T. (2007). Vascular endothelial growth factor (VEGF) suppresses ovarian granulosa cell apoptosis *in vitro*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 363(3), 733–737. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.09.061>
- Lee, M. Y., Luciano, A. K., Ackah, E., Rodriguez-Vita, J., Bancroft, T. A., Eichmann, A., ... Sessa, W. C. (2014). Endothelial Akt1 mediates angiogenesis by

- phosphorylating multiple angiogenic substrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(35), 12865–12870. <https://doi.org/10.1073/pnas.1408472111>
- Liang, Y., Brekken, R. A., & Hyder, S. M. (n.d.). Vascular endothelial growth factor induces proliferation of breast cancer cells and inhibits the anti-proliferative activity of anti-hormones. *Endocrine-Related Cancer Endocr Relat Cancer*, 13(3), 905–919. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01221>
- Liao, Y., & Hung, M.-C. (2010). Physiological regulation of Akt activity and stability. *American Journal of Translational Research*, 2(1), 19–42. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20182580>
- López Albors, O., Olsson, F., Llinares, A. B., Gutiérrez, H., Latorre, R., Candanosa, E., ... Izquierdo-Rico, M. J. (2017). Expression of the vascular endothelial growth factor system (VEGF) in the porcine oviduct during the estrous cycle. *Theriogenology*, 93, 46–54. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.01.028>
- M EN C REYNOSO ROLDAN, A. (2010). *ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DEL HDAC1 EN LA EXPRESIÓN DEL VHL Y DEL VEGF EN EL QUERATINOCITO*.
- Macias, V. R., Pinzón, C., Fierro, F., Vergara, M., Martínez, D., Rosado, A., ... Rosales-Torres, A. M. (2011). Identification of Soluble Forms of Vascular Endothelial Growth Factor receptors, sVEGFR-1 and sVEGFR-2, in Bovine Dominant Follicles. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(3), e39–e42. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01919.x>
- MACLEOD, D. (2006). Principles of Gene Manipulation and Genomics, 7th Edition. S. B. Primrose & R. M. Twyman. Blackwell Publishing. 2006. 626 pages. ISBN 1 405 13544 1. Price £29.99. (paperback). *Genetical Research*, 88(2), 133–134. <https://doi.org/DOI: 10.1017/S0016672306228465>
- Mainero, F. X. S. (2015). *La ingeniería genética, la nueva biotecnología y la era genómica*. Fondo de Cultura Económica.
- Marconi, G., Vighi, D. S., & Aires, B. (n.d.). *Trabajo Original Efecto del VEGF sobre la vascularización , foliculogénesis y apoptosis en el ovario de ratonas*. 21–26.
- Maynard, S. E., Min, J.-Y., Merchan, J., Lim, K.-H., Li, J., Mondal, S., ... Karumanchi, S. A. (2003). Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(5), 649–658. <https://doi.org/10.1172/JCI17189>
- Mirza-Aghazadeh-Attari, M., Mohammadzadeh, A., Yousefi, B., Mihanfar, A., Karimian, A., & Majidinia, M. (2019). 53BP1: A key player of DNA damage response with critical functions in cancer. *DNA Repair*, 73, 110–119. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.11.008>
- Nelson, W. J. (2008). Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin

- complex. *Biochemical Society Transactions*, 36(Pt 2), 149–155.  
<https://doi.org/10.1042/BST0360149>
- Ng, Y.-S., Rohan, R., Sunday, M. E., Demello, D. E., & D'Amore, P. A. (2000). Differential expression of VEGF isoforms in mouse during development and in the adult. *Developmental Dynamics*, 220(2), 112–121.  
[https://doi.org/10.1002/1097-0177\(2000\)9999:9999<::AID-DVDY1093>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/1097-0177(2000)9999:9999<::AID-DVDY1093>3.0.CO;2-D)
- Nowak, D. G., Woolard, J., Amin, E. M., Konopatskaya, O., Saleem, M. A., Churchill, A. J., ... Bates, D. O. (2008). Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors. *Journal of Cell Science*, 121(20), 3487 LP – 3495. Retrieved from  
<http://jcs.biologists.org/content/121/20/3487.abstract>
- Ortega Serrano, P. V., Guzmán, A., Hernández–Coronado, C. G., Castillo-Juárez, H., & Rosales-Torres, A. M. (2016). Reduction in the mRNA expression of sVEGFR1 and sVEGFR2 is associated with the selection of dominant follicle in cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(6), 985–991.  
<https://doi.org/10.1111/rda.12777>
- Ortuzar Marques, N. (2012). *Efectos neurovasculares y cognitivos de la administración intracortical del VEGF y el enriquecimiento ambiental durante el desarrollo postnatal de ratas Long Evans*.
- Park, S. A., Jeong, M. S., Ha, K.-T., & Jang, S. B. (2018). Structure and function of vascular endothelial growth factor and its receptor system. *BMB Reports*, 51(2), 73–78. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2018.51.2.233>
- Peach, C. J., Mignone, V. W., Arruda, M. A., Alcobia, D. C., Hill, S. J., Kilpatrick, L. E., & Woolard, J. (2018). Molecular pharmacology of VEGF-A isoforms: Binding and signalling at VEGFR2. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4).  
<https://doi.org/10.3390/ijms19041264>
- Pidgeon, G. P., Barr, M. P., Harmey, J. H., Foley, D. A., & Bouchier-Hayes, D. J. (2001). Vascular endothelial growth factor (VEGF) upregulates BCL-2 and inhibits apoptosis in human and murine mammary adenocarcinoma cells. *British Journal of Cancer*, 85(2), 273–278. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2001.1876>
- Rangel, P. L., & Gutierrez, C. G. (2014). Reproduction in hens: Is testosterone necessary for the ovulatory process? *General and Comparative Endocrinology*, 203, 250–261. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.03.040>
- Rangel, P. L., Sharp, P. J., & Gutierrez, C. G. (2006). Testosterone antagonist (flutamide) blocks ovulation and preovulatory surges of progesterone, luteinizing hormone and oestradiol in laying hens. *Reproduction*, 131(6), 1109–1114.  
<https://doi.org/10.1530/rep.1.01067>
- Reynolds, L. P., Grazul-Bilska, A. T., & Redmer, D. A. (2000). Angiogenesis in the corpus luteum. *Endocrine*, 12(1), 1–9. <https://doi.org/10.1385/ENDO:12:1:1>

- Ribeiro, L. A., Bacci, M. L., Seren, E., Tamanini, C., & Forni, M. (2007). *Characterization and Differential Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Isoforms and Receptors in Swine Corpus Luteum Throughout Estrous Cycle*. 171(June 2006), 163–171. <https://doi.org/10.1002/mrd>
- Rissanen, T. T., Vajanto, I., Hiltunen, M. O., Rutanen, J., Kettunen, M. I., Niemi, M., ... Ylä-Herttua, S. (2002). Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 (KDR/Flk-1) in Ischemic Skeletal Muscle and Its Regeneration. *The American Journal of Pathology*, 160(4), 1393–1403. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62566-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62566-7)
- Robinson, C. J., & Stringer, S. E. (2001). The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *Journal of Cell Science*, 114(5), 853 LP – 865. Retrieved from <http://jcs.biologists.org/content/114/5/853.abstract>
- Robinson, R. S., Woad, K. J., Hammond, A. J., Laird, M., Hunter, M. G., & Mann, G. E. (2009). Angiogenesis and vascular function in the ovary. *Reproduction*, 138(6), 869–881. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0283>
- Rosales-Torres, A. M., Alonso, I., Vergara, M., Romano, M. C., Castillo-Juárez, H., Ávalos, A., ... Gutiérrez, C. G. (2010). Vascular endothelial growth factor isoforms 120, 164 and 205 are reduced with atresia in ovarian follicles of sheep. *Animal Reproduction Science*, 122(1), 111–117. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.002>
- Rosales, A., & Guzmán, A. (2011). Importancia del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular ( VEGF ) y de sus receptores en el ciclo ovárico . Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 3(1), 89–111.
- Rosales Torres, A. M., & Guzmán Sánchez, A. (2012). Role of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and its receptors during the ovarian cycle. Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 3(1), 89–111.
- Savory, L. J., Stacker, S. A., Fleming, S. B., Niven, B. E., & Mercer, A. A. (2000). Viral Vascular Endothelial Growth Factor Plays a Critical Role in Orf Virus Infection. *Journal of Virology*, 74(22), 10699 LP – 10706. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.22.10699-10706.2000>
- Shepard, P. J., & Hertel, K. J. (2009). The SR protein family. *Genome Biology*, 10(10), 1–9.
- Shibuya, M. (2001). *Structure and Function of VEGF / VEGF-receptor System Involved in Angiogenesis*. 35, 25–35.
- Shibuya, M. (2006). *Differential Roles of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 and Receptor-2 in Angiogenesis*. 39(5), 469–478.
- SHIMIZU, T., JAYAWARDANA, B. C., TETSUKA, M., & MIYAMOTO, A. (2006). Differential Effect of Follicle-Stimulating Hormone (FSH) and Estradiol on Expressions of Vascular Endothelial Growth factor (VEGF) 120, VEGF164 and

- Their Receptors in Bovine Granulosa Cells. *Journal of Reproduction and Development*, *advpub*, 610120035. <https://doi.org/10.1262/jrd.18088>
- SHIMIZU, T., JAYAWARDANA, B. C., TETSUKA, M., & MIYAMOTO, A. (2007). Differential Effect of Follicle-Stimulating Hormone and Estradiol on Expressions of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) 120, VEGF164 and Their Receptors in Bovine Granulosa Cells. *Journal of Reproduction and Development*, *53*(1), 105–112. <https://doi.org/10.1262/jrd.18088>
- Shimizu, Takashi, & Miyamoto, A. (2007). *Progesterone induces the expression of vascular endothelial growth factor ( VEGF ) 120 and Flk-1 , its receptor , in bovine granulosa cells.* *102*, 228–237. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.11.012>
- Shimizu, Toshihiro, Okamoto, H., Chiba, S., Matsui, Y., Sugawara, T., Akino, M., ... Kitabatake, A. (2003). VEGF-mediated angiogenesis is impaired by angiotensin type 1 receptor blockade in cardiomyopathic hamster hearts. *Cardiovascular Research*, *58*(1), 203–212. Retrieved from [http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6363\(02\)00843-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6363(02)00843-X)
- Stalmans, I., Ng, Y. S., Rohan, R., Fruttiger, M., Bouché, A., Yuce, A., ... D'Amore, P. A. (2002). Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *Journal of Clinical Investigation*, *109*(3), 327–336. <https://doi.org/10.1172/JCI0214362>
- Stouffer, R. L., Martínez-Chequer, J. C., Molskness, T. A., Xu, F., & Hazzard, T. M. (2001). Regulation and Action of Angiogenic Factors in the Primate Ovary. *Archives of Medical Research*, *32*(6), 567–575. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0188-4409\(01\)00323-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0188-4409(01)00323-X)
- Sugino, N., Kashida, S., Takiguchi, S., Karube, A., & Kato, H. (2000). Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptors in the Human Corpus Luteum during the Menstrual Cycle and in Early Pregnancy<sup>1</sup>. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *85*(10), 3919–3924. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.10.6888>
- Suh, Y., Afaq, F., Khan, N., Johnson, J. J., Khusro, F. H., & Mukhtar, H. (2010). Fisetin induces autophagic cell death through suppression of mTOR signaling pathway in prostate cancer cells. *Carcinogenesis*, *31*(8), 1424–1433.
- Tahergorabi, Z., & Khazaei, M. (2012). A review on angiogenesis and its assays. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, *15*(6), 1110–1126. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23653839>
- Tamanini, C., & De Ambrogi, M. (2004). Angiogenesis in Developing Follicle and Corpus Luteum. *Reproduction in Domestic Animals*, *39*(4), 206–216. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2004.00505.x>
- Tapia, V., & Romero, C. (2006). Importancia del Factor de Crecimiento Nervioso ( NGF ) en la Función Normal del Ovario y en el Cáncer Ovárico Epitelial. *Revista HCUCH*, *17*, 207–216.

- Taylor, P. D., Wilson, H., Hillier, S. G., Wiegand, S. J., & Fraser, H. M. (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. <https://doi.org/10.1093/molehr/gam056>
- Thomas, S., Vanuystel, J., Gruden, G., Rodriguez, V., Burt, D., Gnudi, L., ... Viberti, G. (2000). Vascular endothelial growth factor receptors in human mesangium in vitro and in glomerular disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, *11*(7), 1236–1243.
- Vajanto, I., Rissanen, T. T., Rutanen, J., Hiltunen, M. O., Tuomisto, T. T., Arve, K., ... Ylä-Herttua, S. (2002). Evaluation of angiogenesis and side effects in ischemic rabbit hindlimbs after intramuscular injection of adenoviral vectors encoding VEGF and LacZ. *The Journal of Gene Medicine*, *4*(4), 371–380. <https://doi.org/10.1002/jgm.287>
- Varey, A. H. R., Rennel, E. S., Qiu, Y., Bevan, H. S., Perrin, R. M., Raffy, S., ... Hassan, A. B. (2008). VEGF 165 b, an antiangiogenic VEGF-A isoform, binds and inhibits bevacizumab treatment in experimental colorectal carcinoma: balance of pro-and antiangiogenic VEGF-A isoforms has implications for therapy. *British Journal of Cancer*, *98*(8), 1366–1379.
- Veikkola, T., Karkkainen, M., Claesson-Welsh, L., & Alitalo, K. (2000). Regulation of Angiogenesis via Vascular Endothelial Growth Factor Receptors. *Cancer Research*, *60*(2), 203 LP – 212. Retrieved from <http://cancerres.aacrjournals.org/content/60/2/203.abstract>
- Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M., & Heldin, C.-H. (1994). Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(43), 26988–26995.
- Weis, S. M., & Cheresh, D. A. (2005). Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature*, *437*(7058), 497–504. <https://doi.org/10.1038/nature03987>
- Wellmann, S., Taube, T., Paal, K., Graf v. Einsiedel, H., Geilen, W., Seifert, G., ... Seeger, K. (2001). Specific Reverse Transcription-PCR Quantification of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Splice Variants by LightCycler Technology. *Clinical Chemistry*, *47*(4), 654–660. <https://doi.org/10.1093/clinchem/47.4.654>
- Woods, D. C., & Johnson, A. L. (2005). Regulation of Follicle-Stimulating Hormone-Receptor Messenger RNA in Hen Granulosa Cells Relative to Follicle Selection1. *Biology of Reproduction*, *72*(3), 643–650. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.104.033902>
- Xin, H., Zhong, C., Nudleman, E., & Ferrara, N. (2016). Evidence for Pro-angiogenic Functions of VEGF-Ax. *Cell*, *167*(1), 275-284.e6. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.054>

- Yamaguchi, S., Iwata, K., & Shibuya, M. (2002). Soluble Flt-1 (Soluble VEGFR-1), a Potent Natural Antiangiogenic Molecule in Mammals, Is Phylogenetically Conserved in Avians. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 291(3), 554–559. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6478>
- Yang, M. Y., & Fortune, J. E. (2007). Vascular endothelial growth factor stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 74(9), 1095–1104. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mrd.20633>
- Yonemura, Y., Fushida, S., Bando, E., Kinoshita, K., Miwa, K., Endo, Y., ... Sasaki, T. (2001). Lymphangiogenesis and the vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-3 in gastric cancer. *European Journal of Cancer*, 37(7), 918–923. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(01\)00015-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0959-8049(01)00015-6)
- Yue, X., & Tomanek, R. J. (2001). Effects of VEGF165 and VEGF121 on vasculogenesis and angiogenesis in cultured embryonic quail hearts. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 280(5 49-5), 2240–2247. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.280.5.h2240>
- Zamora-Gutiérrez, D., Guzmán, A., Hernández-Coronado, C. G., Castillo-Juárez, H., Fierro, F., Gutiérrez, C. G., ... Rosales-Torres, A. M. (2019). Co-ordinated expression of the VEGF system components in granulosa cells to develop a proangiogenic autocrine milieu during ovarian follicle development. *Molecular Reproduction and Development*, 86(2), 156–165. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mrd.23089>
- Zeleznik, A. J. (2004). The physiology of follicle selection. *Reproductive Biology and Endocrinology*, Vol. 2. Retrieved from <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-4344605016&doi=10.1186%2F1477-7827-2-31&partnerID=40&md5=96466199141efa1697fd7325d11ec037>