

# Importancia del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) y de sus receptores en el ciclo ovárico. Revisión

## Role of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and its receptors during the ovarian cycle. Review

Ana María Rosales Torres<sup>a</sup>, Adrián Guzmán Sánchez<sup>a</sup>

### RESUMEN

El objetivo de esta revisión fue recopilar y analizar la información más reciente acerca del papel del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF, por sus siglas en inglés), sus receptores de membrana (VEGFR1 y VEGFR2) y receptores solubles (sVEGFR1 y sVEGFR2), durante los procesos involucrados en el ciclo ovárico. La principal función del sistema VEGF (VEGF y sus receptores), es controlar la formación de nuevos vasos sanguíneos y la protección de células endoteliales y de la granulosa. Es conocido que durante el ciclo ovárico, los cambios vasculares son importantes para controlar el desarrollo folicular, la ovulación y la formación y regresión del cuerpo lúteo (CL). En la selección folicular, VEGF y el receptor VEGFR2 incrementan su expresión para favorecer el aporte de nutrientes al folículo. En la ovulación VEGF, VEGFR1 y VEGFR2 reducen su expresión para evitar una hemorragia, y se incrementa inmediatamente después para promover la formación de vasos sanguíneos y el desarrollo del CL. Finalmente durante la regresión del CL el VEGF y VEGFR2 reducen su expresión coincidiendo con la muerte de las células que lo forman. Las evidencias revisadas permiten sugerir que VEGF y VEGFR2 son los principales promotores de la angiogénesis y protección celular en el desarrollo del folículo y CL, sin embargo los otros miembros del sistema VEGF; VEGFR1 y sVEGFR1 y sVEGFR2, parecen desempeñar funciones anti-angiogénicas en los procesos ováricos mencionados.

**PALABRAS CLAVE:** Sistema VEGF, Desarrollo folicular, Ovulación, CL.

### ABSTRACT

The aim of present review was to compile the more recent information related with the role of VEGF and its receptors during ovarian cycle. The main function of VEGF system (VEGF and its receptors), is to control the new blood vessels formation and the protection of endothelial and granulosa cells. It is known that during the ovarian cycle, the vascular changes are important to regulate the follicular and corpus luteum development (CL), as well that the ovulation. The evidences reviewed here shown that during follicular selection, VEGF and VEGF receptor-2 (VEGFR2) increase their expression to promote the nutrients supply and follicular cell protection, while in the ovulation VEGF system reduces the expression but this increases rapidly to induce the new blood vessel formation and thus the CL development. Finally, during the CL regression the expression of VEGF and VEGFR2 is reduced coinciding with the cell death of the gland. The results present herein suggest that VEGF and its receptor 2 are the main promoters of angiogenesis and cellular protection during follicular and CL development, however others members of VEGF system such as VEGF receptor-1 and the soluble receptors (sVEGFR1 and sVEGFR2) seem to have an anti-angiogenic role.

**KEY WORDS:** SEGF, Ovulation, CL, Receptors, Follicular development.

### INTRODUCCIÓN

La función ovárica de las hembras depende del establecimiento y la remodelación continua de un

### INTRODUCTION

Ovarian function of females depends on the establishment and continuous remodelling of a

Recibido el 10 de diciembre de 2010. Aceptado el 25 de abril de 2011.

<sup>a</sup> Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción. Departamento de Producción Agrícola y Animal. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Delegación Coyoacán, 04960, México, D.F. Edificio 34. Tel. 5483 7000 ext 3082. anamaria@correo.xoc.uam.mx. Correspondencia al primer autor.

sistema vascular complejo, que le suministre al folículo y al cuerpo lúteo el oxígeno, los nutrientes y las hormonas que demandan en cada una de las etapas de su desarrollo; además que le permitan la salida a los esteroides que se producen en las células foliculares y lúteas para alcanzar sus respectivos órganos blanco. Los folículos que llegan a la ovulación tienen una extensa red de capilares que soportan su crecimiento y maduración<sup>(1,2)</sup>, mientras que la muerte de las células endoteliales de la teca<sup>(3)</sup> y la degeneración del lecho capilar del folículo que conllevan a un suministro vascular insuficiente, parecen ser disparadores de la atresia<sup>(2,4)</sup>. El análisis del flujo sanguíneo por ultrasonido, sugiere que los folículos dominantes tienen mejor perfusión sanguínea que los subordinados<sup>(5)</sup>. El folículo dominante que se desarrolla bajo el efecto del pico de la hormona luteinizante (LH), ocasionado por la alta frecuencia de pulsos de esta hormona, se luteinizará, ovulará y se convertirá en un cuerpo lúteo (CL). Durante este proceso de transformación, las células de la granulosa se diferencian a células lúteas grandes (LLC) y las de la teca a células lúteas pequeñas (SLC)<sup>(4)</sup>, capaces de producir progesterona. Estos cambios en la producción de esteroides se dan por el incremento en la expresión de enzimas que convierten colesterol a progesterona (P450 ssc y 3 $\alpha$ -HSD), y el decremento en la expresión de las que convierten progesterona a estrógenos (P450 17- $\alpha$  y P450arom).

Además de las células lúteas, el CL está conformado por fibroblastos, por células de músculo liso y principalmente por células endoteliales, las cuales durante la formación y desarrollo del CL forman una red vascular que garantiza el suministro de hormonas, nutrientes y oxígeno. El funcionamiento del CL, se pierde por la muerte programada que ocurre en sus células, y por la vasoconstricción provocada por la prostaglandina PGF2 $\alpha$  producida en el endometrio, que también conlleva a la muerte de las células lúteas y endoteliales<sup>(1)</sup>.

La interacción del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), con sus receptores de membrana; VEGFR1 y VEGFR2, se reconoce como el principal estimulador de la angiogénesis

complex vascular system, which provide to the follicle and the corpus luteum, the oxygen, nutrients and hormones that demand in each of the stages of its development, moreover the vescular system allowing the output to the steroids produced in luteal and follicular cells to reach their respective target cell. The follicles arriving at ovulation have an extensive network of capillaries that support their growth and maturation<sup>(1,2)</sup>, while the death of endothelial cells of theca<sup>(3)</sup> and the degeneration of the capillary bed of the follicle that lead to an inadequate vascular supply, appear to triggers the atresia<sup>(2,4)</sup>. Analysis of ultrasonic blood flow, suggests that the dominant follicles have better blood perfusion than subordinate follicles<sup>(5)</sup>. The dominant follicle which develops under the influence of the peak of the luteinizing hormone (LH), caused by the high-frequency pulses of this hormone, it will luteinize; it will ovulate and will become a corpus luteum (CL). During this process of transformation, the granulosa cells differentiate to large luteal cell (LLC) and the theca cells to small luteal cells (SLC)<sup>(4)</sup>, capable of producing progesterone. These changes in the production of steroids are given by the increase in the expression of enzymes that converted cholesterol to progesterone (P450 ssc and 3 $\alpha$ -HSD), and the decrease in the expression of enzymes that convert progesterone to estrogens (P450 17- $\alpha$  and P450arom).

In addition to luteal cells, the CL is formed by fibroblasts, smooth muscle cells and by endothelial cells, which during the formation and development of the CL form a vascular network that guarantees the supply of hormones, nutrients and oxygen. The function of the CL is lost by apoptosis, and the vasoconstriction caused by prostaglandin F2 $\alpha$  (PGF2- $\alpha$ ) produced in the endometrium, which also leads to the death of luteal cells and endothelial cells<sup>(1)</sup>.

The interaction of the vascular endothelial growth factor (VEGF), with its membrane receptors (VEGFR1 and VEGFR2) is recognized as the main stimulator of angiogenesis (proliferation, migration and survival of endothelial cells), both in the ovary and in other tissues<sup>(6,7)</sup>. Recently, soluble forms

(proliferación, migración y supervivencia de las células endoteliales), tanto en el ovario como en otros tejidos<sup>(6,7)</sup>. Recientemente se conocen las formas solubles de los receptores de membrana para VEGF: sVEGFR1 y sVEGFR2, los cuales aparentemente tienen un efecto anti-angiogénico al capturar al ligando, evitando que tenga interacción con los receptores de membrana<sup>(8)</sup>. Nosotros hemos llamado sistema VEGF, al ligando, a los receptores de membrana y a los receptores solubles, por lo cual en adelante así será referido. En este trabajo se describen las evidencias que existen de la participación del sistema VEGF en el desarrollo folicular, ovulación, formación y regresión del cuerpo lúteo.

## Generalidades

### *Angiogénesis*

El brote de un nuevo vaso a partir de uno ya existente, es el mecanismo más frecuente en la angiogénesis, la cual ocurre en varios procesos fisiológicos, entre los que destacan el desarrollo embrionario, el desarrollo folicular y el desarrollo del CL, así como en procesos patológicos, como es la formación de tumores. La angiogénesis, involucra varios pasos secuenciales<sup>(9)</sup>; primero, los componentes del entorno de la matriz extracelular endotelial son degradados localmente por proteasas producidas por la propia célula endotelial. A esto le sigue la migración quimiotáctica de células endoteliales hacia el lugar donde se desarrollará el nuevo vaso sanguíneo. Subsecuentemente en la sección media del vaso en formación, las células endoteliales proliferan y se ensamblan para formar el lumen del vaso sanguíneo. El nuevo vaso sufre anastomosis con el vaso adyacente para ser perfundido con circulación sanguínea<sup>(9,10,11)</sup>. Hasta este punto, el capilar recientemente formado, es frágil y puede ser remodelado. La maduración del nuevo vaso sanguíneo hacia un vaso estable y funcional, requiere la acumulación de una lámina basal, y el recubrimiento por pericitos y células de músculo liso para fortalecerlo<sup>(12)</sup>.

### *Regulación de la angiogénesis*

En un inicio, cuando se estudiaron las moléculas que regulan la angiogénesis, se propuso a los

of membrane receptors of VEGF (sVEGFR1 and sVEGFR2) were reported, which apparently have an anti-angiogenic effect because capturing to the ligand, avoids an interaction with the receptor membrane<sup>(8)</sup>. We have called VEGF system, to the ligand, membrane receptors and soluble receptors, which henceforth so will be mentioned. This review describes the evidence existing of VEGF system's role on follicular development, ovulation, formation and regression of corpus luteum.

## Overview

### *Angiogenesis*

The outbreak of a new vessel from an existing one, is the commonest in angiogenesis, which occurs in many physiological processes including embryonic development, follicular and CL development, as well as in disease processes, such as the tumors development. Angiogenesis, involves several sequential steps<sup>(9)</sup>; first, the extracellular matrix components are locally degraded by proteases produced by endothelial cell, this is followed by the chemotactic migration of endothelial cells towards the place where the new blood vessel is build. Subsequently in the midsection of the vessel in formation, the endothelial cells proliferate and are assembled to form the lumen of the blood vessel. The new vessel suffers anastomosis with the adjacent one to be perfused with blood circulation<sup>(9,10,11)</sup>. At this point, the recently formed capillary is fragile and can be remodeled. The maturation of the new blood vessel towards a stable and functional one, requires the accumulation of a basal lamina, and coating for pericytes and smooth muscle cells to strengthen it<sup>(12)</sup>.

### *Regulation of angiogenesis*

Initially, when molecules that regulate angiogenesis were studied, it was proposed the fibroblastic growth factors (FGF) as key regulators of the process, however knockout mice for these genes, did not develop vascular defects<sup>(13)</sup>, so the existence of other molecules that control the new blood vessel formation was considered. Since 1989, when VEGF was discovered, it has been considered as the main factor involved in angiogenesis<sup>(14)</sup>.

factores de crecimiento fibroblásticos (FGF) como los principales reguladores del proceso; sin embargo ratones nocaout para estos genes, no desarrollaron defectos vasculares<sup>(13)</sup>, por lo que se pensó en la existencia de otras moléculas que controlan la formación de nuevos vasos sanguíneos. Así fue como en 1989, se descubrió el VEGF, al que se le ha considerado como el principal factor involucrado en la angiogénesis<sup>(14)</sup>.

Dentro de las moléculas que regulan la neovascularización, VEGF juega un papel central durante el proceso angiogénico en condiciones tanto fisiológicas como patológicas; es un potente mitógeno de células endoteliales derivadas de arterias y venas, aunque también ha mostrado tener una importante actividad mitótica en otros tipos celulares<sup>(15)</sup>, entre los que destacan las neuronas<sup>(9,16)</sup> y la actividad citoprotectora en las células de la granulosa<sup>(17)</sup>.

#### *VEGF*

La familia de proteínas del VEGF, incluyen al VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y el factor de crecimiento placentario (PLGF)<sup>(7)</sup>. Algunos otros autores incluyen dos miembros más que son referidos como VEGF-E<sup>(9)</sup> y VEGF-F<sup>(18)</sup>. De esta familia de transcritos, el más estudiado es el VEGF-A, que es referido simplemente como VEGF. El VEGF-B y PLGF se unen a VEGFR1 y modulan la actividad de VEGF-A en células endoteliales durante el desarrollo embrionario (VEGF-B) y durante la angiogénesis patológica (PLGF)<sup>(8)</sup>. Aunque VEGF-C y VEGF-D se unen a VEGFR2 en células endoteliales de vasos sanguíneos, estos miembros de la familia de VEGF se unen a su receptor (VEGFR3) en tejido linfático para promover el desarrollo de vasos linfáticos durante el desarrollo embrionario<sup>(7,18)</sup>. Finalmente VEGF-E es un homólogo de VEGF producido por el virus Orf que afecta a cabras y ovejas<sup>(9)</sup> mientras que del VEGF-F no se ha caracterizado del todo su función<sup>(18)</sup>.

El VEGF ha sido caracterizado como un factor de crecimiento angiogénico que se une a heparina<sup>(19)</sup>, y que exhibe una alta especificidad para las células

VEGF plays a central role during the angiogenic in both, physiological and pathological conditions; it is a powerful mitogene of endothelial cells derived from arteries and veins, although he has also shown to have mitotic activity in other cell types<sup>(15)</sup>, as neurons<sup>(9,16)</sup> and citoprotector activity in granulosa cells<sup>(17)</sup>.

#### *VEGF*

The VEGF protein family, include VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D and placental growth factor (PLGF)<sup>(7)</sup>. Some other authors include two other members referred as VEGF-E<sup>(9)</sup> and VEGF-F<sup>(18)</sup>. From this trascrypt family, the most studied is the VEGF-A, which is referred only as VEGF. The VEGF-B and PLGF bind to VEGFR1 and modulate of VEGF-A activity in endothelial cells during embryonic development (VEGF-B) and pathological angiogenesis (PLGF)<sup>(8)</sup>. Although VEGF-C and VEGF-D bind to VEGFR2 in endothelial cells of blood vessels, these members of the VEGF family bind to its receptor (VEGFR3) in lymph tissue to promote the development of lymphatic vessels during embryonic development<sup>(7,18)</sup>. Finally VEGF-E is a homologue of VEGF produced by the virus Orf which affects goats and sheep<sup>(9)</sup>, whereas VEGF-F function has not been fully characterized<sup>(18)</sup>.

The VEGF has been characterized as an angiogenic growth factor that binds to heparin<sup>(19)</sup>, and exhibits a high specificity for endothelial cells<sup>(20)</sup> of arteries, veins and lymphatic vessels<sup>(21)</sup>. VEGF seems to have three forms of participation in the normal vascular development, first is able to initiate angiogenesis promoting proliferation and quimioatracción of endothelial cells<sup>(22)</sup>. In cells cultures from human umbilical vein endothelial cell (HUVEC), the addition of 3 or 10 ng/ml of VEGF to the culture medium, increases both, proliferation and migration of these cells. This effect is also reflected as an increase in the vascular network of alveoli treated with VEGF<sup>(23)</sup>. These results are consistent by other authors in porcine aortic endothelial cells (PAE)<sup>(24)</sup> and human umbilical vein (HUVEC)<sup>(25)</sup>. Second, maintaining the viability of vessel blood immature, and third

endoteliales<sup>(20)</sup> de arterias, venas y vasos linfáticos<sup>(21)</sup>. El VEGF parece tener tres formas de participación en el desarrollo vascular normal, primero es capaz de iniciar la angiogénesis promoviendo la proliferación y quimioatracción de las células endoteliales<sup>(22)</sup>. En cultivo de células de la vena umbilical de humano, la adición de 3 o 10 ng/ml de VEGF al medio de cultivo, incrementa tanto la proliferación como la migración de dichas células. Este efecto se ve también reflejado como un incremento en la red vascular de alvéolos tratados con VEGF<sup>(23)</sup>. Estos resultados coinciden con lo reportado anteriormente por otros autores en células endoteliales de la aorta porcina (EAP)<sup>(24)</sup> y de la vena umbilical de humano (HUVEC)<sup>(25)</sup>. Segundo, mantiene la viabilidad de vasos sanguíneos inmaduros y tercero facilita el recubrimiento del vaso con pericitos<sup>(26)</sup>. Con relación a la viabilidad de vasos sanguíneos inmaduros, VEGF participa en la supervivencia de las células endoteliales induciendo la expresión de proteínas antiapoptóticas tales como Bcl-2 y A1<sup>(26)</sup>. La actividad antiapoptótica de VEGF está mediada por la activación de la vía del fosfatidilinositol 3- cinasa/ akt<sup>(27)</sup>.

La expresión del VEGF está modulada por un sin número de factores de crecimiento y citocinas. Los oncogenes, *v-ras*, *K-ras*, *v-raf*, *src fos* y *v-yes*, son fuertes inductores de la expresión de VEGF; sin embargo se sabe que la hipoxia y la hipoglicemia son los principales inductores de la síntesis de VEGF<sup>(20,28)</sup>. Por ejemplo, en las regiones hipóxicas de algunos tumores existe un incremento en la expresión del ARNm de VEGF<sup>(19)</sup>. Se ha reportado que el factor inductor de hipoxia 1(HIF-1) favorece la expresión del VEGF y de óxido nítrico (NO), y que al inhibir al HIF-1 por el FK228 (un potente inhibidor de la diacetilaza histona) se frena la expresión del VEGF en respuesta a la hipoxia tanto a nivel transcripcional como traduccional<sup>(29)</sup>. Por otro lado el gen supresor del ciclo celular, p53 juega un papel importante en la inhibición de la angiogénesis y la expresión de VEGF. La proteína producto del gen p53 es la principal inductora de la apoptosis y participa en la secreción de la trombospondina 1 (TSP 1), una glicoproteína endógena que inhibe la angiogénesis<sup>(30)</sup>. Mutaciones

facilitates the coating of the vessel with pericytes<sup>(26)</sup>. With regard to the immature blood vessels viability, VEGF participates in the endothelial cells survival, by inducing the expression of antiapoptotic proteins such as Bcl-2 and A1<sup>(26)</sup>. The antiapoptotic VEGF activity is mediated by the activation of the pathway of fosfatidilinositol 3-kinase/akt<sup>(27)</sup>.

The expression of VEGF is modulated by several growth factors and cytokines. The oncogenes *v-ras*, *K*, *v-raf*, *src fos* and *v-yes*, increase the expression of VEGF; however, it is known that hypoxia and hypoglycemia are the main stimuli of VEGF synthesis<sup>(20,28)</sup>. For example, in the hypoxic regions of some tumors there is an increase in the expression of VEGF RNAm<sup>(19)</sup>. It is reported that hypoxia-inducible Factor-1 (HIF-1) promote the expression of VEGF and nitric oxide (NO), and the HIF-1 inhibition by the FK228 (a potent inhibitor of diacetyl histone) reduce the expression of VEGF in response to hipoxia, both at transcriptional and translational level<sup>(29)</sup>. On the other hand the cell cycle suppressor gene p53 inhibits the angiogenesis and the expression of VEGF. The protein product of the p53 gene is the main apoptosis inductor and participates in the secretion of the thrombospondin 1 (TSP 1), an endogenous glycoprotein that inhibits angiogenesis<sup>(30)</sup>. Mutations that inactivate the p53 gene, stimulate cell proliferation and cause an increase in the expression of VEGF<sup>(31)</sup>. Although the TSP 1 appears to be the most important molecule to inhibit the expression of VEGF, there are others such as the angiostatin, endostatin, prolactin, interferons (INF- $\alpha$ , INF- $\alpha$ ), plaquetary factor 4 (PF-4), interleukins (IL 12 IL 4), inhibitors of metalloproteinases (TIMP 1, TIMP 2), testosterone, somatostatin, melatonin, and metoxiestradiol, which can also block the neo formation of vessels through the inhibition of VEGF<sup>(31,32)</sup>.

#### *VEGF isoforms and angiogenesis*

Five angiogenic isoforms derived from a single gene of VEGF have been identified in human: VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189 and VEGF206. These isoforms are a result of splicing-alternative process of RNAm of VEGF, which

que inactivan al gen p53, estimulan la proliferación celular y ocasionan un incremento en la expresión de VEGF<sup>(31)</sup>. Aunque la TSP 1 parece ser la molécula más importante para inhibir la expresión de VEGF, existen otras como la angiostatina, endostatina, prolactina, interferones (INF  $\alpha$  INF  $\alpha$ ), factor plaquetario 4 (PF 4), interleucinas (IL 12 IL 4), inhibidoras de metaloproteinasas (TIMP 1, TIMP 2), testosterona, somatostatina, melatonina y metoxiestradiol, que también pueden bloquear la neo formación de vasos sanguíneos por medio de la inhibición de VEGF<sup>(31,32)</sup>.

#### *Isoformas del VEGF y angiogénesis*

En humanos se han identificado cinco isoformas angiogénicas derivadas de un solo gen de VEGF; VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189 y VEGF206. Estas isoformas son resultado del proceso de maduración alternativo por corte y empalme del ARNm de VEGF, que contiene ocho exones<sup>(33)</sup>. Tres tipos de DNA complementario (cDNA) del VEGF humano (hVEGF) se aislaron de una biblioteca de cDNA preparada de células leucémicas HL60. Los cDNAs codifican para una proteína con 95 % de similitud al VEGF bovino que tiene 165 aminoácidos a la que se le denomina VEGF165; de las otras dos proteínas una contiene 121 aminoácidos (VEGF121) y la otra 189 (VEGF189). La cuarta isoforma de VEGF fue identificada en bibliotecas de cDNA de hígado fetal, y la proteína madura está formada por 206 aminoácidos (VEGF206). Como mencionamos, estas cuatro isoformas de VEGF son originadas del corte y empalme alternativo del ARNm inmaduro, y los cambios están relacionados con los exones 6 y 7 del gen. Una quinta isoforma, el VEGF145 ha sido identificada en el endometrio y miometrio humano<sup>(34,35)</sup>. Las isoformas VEGF121 y VEGF165 son más ácidas y no se unen fácilmente a la heparina, y por lo tanto llegan fácilmente hacia la célula endotelial. En contraste, las isoformas VEGF189 y el VEGF206 son básicas y se unen a la heparina con mayor facilidad, permaneciendo completamente secuestradas en la matriz extracelular<sup>(21)</sup>. Las isoformas 189 y 206 por acción de la plasmina, pueden dar lugar a la formación de una proteína de 110 aminoácidos (VEGF110) capaz

contains eight exons<sup>(33)</sup>. Three types of complementary DNA (cDNA) of human VEGF (hVEGF) isolated from a cDNA library of leukemia cells HL60. The cDNAs encoding a protein with 95 % similarity to bovine VEGF has 165 amino acids which is called VEGF165; two other proteins, one contains 121 amino acids (VEGF121) and the other 189 (VEGF189). The fourth isoform of VEGF was identified in fetal liver cDNA libraries, and the mature protein is composed of 206 amino acids (VEGF206). As mentioned, these four isoforms of VEGF are originated from splicing-alternative of the immature RNAm, and the changes are related to the exon 6 and 7 of the gene. A fifth isoform, the VEGF145, has been identified in the human endometrium and myometrium<sup>(34,35)</sup>. The VEGF121 and VEGF165 isoforms are more acidic and not easily bind to heparin, and therefore come easily to the endothelial cell. In contrast, VEGF189 and the VEGF206 isoforms are basic and bind to heparin, remaining completely sequestered in the extracellular matrix<sup>(21)</sup>. Isoforms 189 and 206, by plasmin action, may lead to the formation of a 110 amino acids (VEGF110) protein capable of binding to VEGFR1 and VEGFR2 in endothelial cell<sup>(7)</sup>. This phenomenon is important during angiogenesis, since acid isoforms begin angiogenic process, promote the activation of proteases that degrade the matrix, and thus the release of basic isoforms that are linked to the extracellular matrix to enhance the proliferation and migration of endothelial cells<sup>(36)</sup>. Finally, VEGF145 is mainly expressed by tumoral cells of the female reproductive system<sup>(37)</sup>. Is worth mentioning that in all animals, including cattle, all proteins, product of the isoforms of VEGF, have one fewer amino acid<sup>(2)</sup>.

#### *VEGF Receptors*

The biological activity of VEGF is mediated primarily by two tyrosine kinase receptor: VEGFR-1 or Flt-1 (fms-like tyrosine kinase-1), and VEGFR-2 or Flk-1 (fetal liver kinase-1); however other receptors such as the VEGFR-3 or Flt-4, the neuropilin 1 and 2 (NPR-1 and NPR-2 respectively) which also binds VEGF<sup>(9,16,20,33)</sup>. The receptors of major importance by his affinity with the ligand are: VEGFR1 and VEGFR2, both receptors are

de unirse a VEGFR1 y VEGFR2 en la célula endotelial<sup>(7)</sup>. Este fenómeno es de vital importancia durante la angiogénesis, ya que las isoformas ácidas inician el proceso angiogénico, promoviendo la activación de proteasas que degradan la matriz, y con ello la liberación de las isoformas básicas que se encuentran secuestradas en la matriz extracelular para potenciar la proliferación y migración de células endoteliales<sup>(36)</sup>. Finalmente VEGF145 es expresado principalmente por células cancerosas del sistema reproductor femenino<sup>(37)</sup>. Cabe mencionar que en todos los animales, incluyendo los bovinos, todas las proteínas producto de las isoformas de VEGF tienen un aminoácido menos<sup>(2)</sup>.

#### *Receptores del VEGF*

La actividad biológica del VEGF está mediada principalmente por dos receptores tipo tirosina cinasa: el VEGFR-1 ó Flt-1 (fms-like tyrosine kinase-1, por sus siglas en inglés), y el VEGFR-2 ó Flk-1 (fetal liver kinase-1, por sus siglas en inglés), sin embargo se han reportado otros receptores tales como el VEGFR-3 o Flt-4, la neuropilina 1 y 2 (NRP-1 y NRP-2 respectivamente) a los cuales también se une el VEGF<sup>(9,16,20,33)</sup>. Los receptores de mayor importancia por su afinidad con el ligando son: VEGFR1 y VEGFR2, ambos receptores se caracterizan por tener siete dominios extracelulares de unión similares a inmunoglobulinas, una sola región transmembranal y un dominio tirosina cinasa intracelular<sup>(7,35)</sup>.

El VEGF se une al VEGFR1 con una constante de disociación (Kd) de 10-20 pM, por lo que se considera que el factor tiene una alta afinidad para este receptor<sup>(38)</sup> en comparación con el VEGFR2 que tiene una Kd de 75 a 125 pM<sup>(24)</sup>. Sin embargo, la capacidad de autofosforilación de VEGFR2 es al menos 10 veces mayor que la del VEGFR1, lo cual indica que el VEGFR2 tiene una mayor capacidad en la traducción de la señal de VEGF<sup>(24,25)</sup>. Se considera que VEGFR2 es el mayor mediador de los efectos mitogénicos, angiogénicos y de permeabilidad de VEGF<sup>(36)</sup>. En contraste, VEGF unido al VEGFR-1 también se le han atribuido efectos proliferativos<sup>(25)</sup>, quimiotácticos y de protección de células endoteliales<sup>(36)</sup>, aunque

characterized by seven union extracellular domains like immunoglobulin, a single transmembrane region and a tyrosine kinase intracellular domain<sup>(7,35)</sup>.

VEGF joins the VEGFR1 with a constant of dissociation (Kd) 10-20 pM, so it is considered that the factor has a high affinity for this receptor<sup>(38)</sup> in comparison with the VEGFR2 with a Kd of 75 to 125 pM<sup>(24)</sup>. However, the fosforilation of VEGFR2 is at least 10 times greater than VEGFR1, which indicates that the VEGFR2 has a greater capacity in the translation of the signal of VEGF<sup>(24,25)</sup>. VEGFR2 is considered the greatest mediator of mitogenic, angiogénicos and permeability effects of VEGF<sup>(36)</sup>. In contrast, VEGF bind to VEGFR-1 also have proliferative effects<sup>(25)</sup>, chemotactic and protection of endothelial cells<sup>(36)</sup>, although with the limited ability of signaling, is generally considered a "decoy" receptor<sup>(25)</sup>.

This evidence suggests that both receptors trigger different effects in response to the ligand. Thus the VEGFR1 may regulate angiogenesis by making less available the ligand to VEGFR2<sup>(25)</sup>. Additionally, by splicing.alternative of the immature RNAm of VEGFR-1 and VEGFR-2, are synthesized soluble forms of both receptors (sVEGFR-1 and sVEGFR-2), these receptors proteins lose the intracellular and transmembrane domain, and therefore can not translate signs; however, maintain the domains of union to the ligand, retaining the same affinity for VEGF that membrane receptors<sup>(39)</sup>. Because of this, some authors suggest that there is competition for the ligand between soluble receptors and those of the membrane, which gives the first anti-angiogenic effect<sup>(40)</sup>.

#### **Participation of VEGF in the follicular development**

##### *Follicular development*

The follicular development that occurs in the estrous/menstrual cycle occurs in the form of waves, formed by cohorts or groups of follicles that during the initial recruitment, are elected to continue its growth in response to gonadotropin (cyclic recruitment)<sup>(41,42)</sup>. In each wave, recruited follicles

por su limitada capacidad de señalización, es generalmente considerado un receptor "anzuelo" (25).

Estas evidencias sugieren que ambos receptores desencadenan efectos diferentes en respuesta al ligando. Así, el VEGFR1 puede regular la angiogénesis haciendo poco disponible el ligando a VEGFR2 (25). Adicionalmente por corte y empalme de los ARNm inmaduros de VEGFR-1 y VEGFR-2, se producen formas solubles de ambos receptores (sVEGFR-1 y sVEGFR-2), las proteínas de estos receptores pierden el dominio transmembranal e intracelular con lo cual no pueden traducir señales, sin embargo, mantienen los dominios de unión al ligando, conservando la misma afinidad por VEGF, que los receptores de membrana (39). Por lo anterior algunos autores sugieren que existe una competencia por el ligando entre los receptores solubles y los de membrana, que les confiere a los primeros un efecto antiangiogénico (40).

### Participación de VEGF en el desarrollo folicular

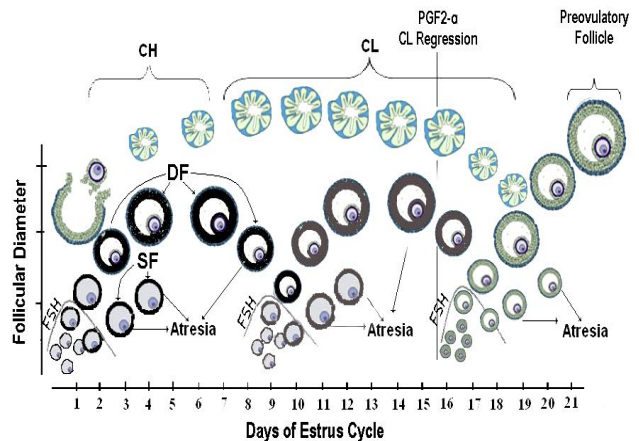
#### Desarrollo folicular

El desarrollo folicular que se presenta en el ciclo estral/menstrual, ocurre en forma de ondas u olas, conformadas por cohortes o grupos de folículos que durante el reclutamiento inicial, son elegidos para continuar su crecimiento en respuesta a gonadotropinas (reclutamiento cíclico) (41,42). En cada ola, se establece entre los folículos reclutados una competencia por la dominancia, en la cual uno o varios folículos (dependiendo de la especie) de la cohorte adquiere el desarrollo competente que le permitirá seguir creciendo en un ambiente de bajas concentraciones de gonadotropinas, al tiempo en que sus compañeros de cohorte sufren atresia. El folículo dominante modifica el patrón de crecimiento de los folículos subordinados en ambos ovarios, mediante la producción de estradiol e inhibina que actúan en forma endocrina, autocrina o paracrina para autopotenciar su desarrollo e inhibir el de los subordinados. En las especies monotocas el folículo dominante de la primera ola del ciclo, emerge mientras está activo el CL, de tal manera que la progesterona secretada por esta glándula transitoria, reduce la frecuencia de pulsos de LH, evitando su

competir por dominancia, en la cual uno o varios folículos de la cohorte (dependiendo de la especie) adquiere desarrollo competente que le permitirá continuar creciendo en un ambiente de bajas concentraciones de gonadotropinas, al tiempo que sus compañeros de cohorte sufren atresia. El folículo dominante modifica el patrón de crecimiento de los folículos subordinados en ambos ovarios, a través de la producción de estradiol e inhibina que actúan en forma endocrina, autocrina o paracrina para autopotenciar su desarrollo e inhibir el de los subordinados. En especies monotocas el folículo dominante de la primera ola del ciclo, emerge como el CL activo, de tal manera que la progesterona secretada por esta glándula transitoria, reduce la frecuencia de pulsos de LH, evitando que los demás folículos de la cohorte puedan competir por dominancia. El mismo ocurrirá con todos los folículos dominantes que aparecen durante la fase lútea del ciclo. El folículo dominante que se desarrolla en la fase folicular del ciclo será estimulado por la alta frecuencia de pulsos de LH para completar su maduración y ovular (43,44). La Figura 1 muestra el esquema clásico del desarrollo folicular en una vaca con tres ondas de crecimiento, donde solo el folículo de la última ola puede ovular.

Figura 1. Modelo esquemático de las olas de crecimiento folicular y desarrollo del CL en bovinos

Figure 1. Schematic model of the follicular waves and development of the CL in cattle



DF= dominant follicle; FS= follicle subordinate; CH= corpus hemorrhagic; FSH= follicle stimulating hormone; PGF2- $\alpha$ = prostaglandin F2 $\alpha$ .



ovulación y provocándole atresia. Lo mismo ocurrirá con todos los folículos dominantes que aparezcan durante la fase lútea del ciclo. El folículo dominante que se desarrolle en la fase folicular del ciclo será estimulado por la frecuencia alta de pulsos de LH para terminar su maduración y ovular<sup>(43,44)</sup>. En la Figura 1 se muestra el esquema clásico de desarrollo folicular en una vaca con tres olas de crecimiento, donde sólo el folículo de la última ola podrá ovular.

*VEGF y sus receptores durante la selección y dominancia folicular*

En el ovario de las hembras de los mamíferos, los folículos primordiales y primarios reciben oxígeno y nutrientes por difusión pasiva desde los vasos sanguíneos del estroma, debido a que en estos estadios, los folículos carecen de irrigación propia. La red capilar individual, se inicia en los folículos secundarios en cuanto aparece la capa celular de la teca<sup>(45)</sup>. Durante la formación de los folículos preantrales, hay un gran incremento no sólo en el total de la vasculatura, sino también en la densidad vascular dado que aproximadamente el 40 % de las células que proliferan en la teca en este estadio, son de origen endotelial<sup>(46)</sup>. En el estado antral de los folículos, la capa vascular está formada por dos redes concéntricas de vasos sanguíneos, una de ellas ubicada directamente por fuera de la membrana basal y la otra en la teca externa<sup>(47)</sup>. Estas redes capilares, en un folículo íntegro no penetran hacia la granulosa<sup>(48,49,50)</sup>, por lo que esta capa celular permanece avascular durante todo el desarrollo folicular<sup>(51)</sup>.

El establecimiento del plexo capilar de la teca interna, coincide con el período de rápido crecimiento y diferenciación de los folículos, por lo que se ha propuesto que un factor que condiciona la selección del folículo dominante, además de su producción de estradiol y respuesta a gonadotropinas, es la capacidad de desarrollar una mayor red vascular, así como un incremento en la permeabilidad vascular<sup>(22)</sup>. Se ha puesto en evidencia que los folículos dominantes tienen una mayor y mejor irrigación que los folículos subordinados, y que estos últimos presentan una rápida degeneración de

*VEGF and its receptors during selection and follicular dominance*

In the ovary of female mammals, primary and primordial follicles receive oxygen and nutrients by passive diffusion from the blood vessels of the stroma, because in these stages, the follicles have no own irrigation. The individual capillary network, begins in secondary follicles as soon as the cell layer of theca appears<sup>(45)</sup>. During the formation of preantral follicles, there is an increase not only in the total vascularity, but the vascular density also, because approximately 40 % of the cells which are proliferating in the theca at this stage are of endothelial origin<sup>(46)</sup>. In antral follicles, the vascular layer consists of two concentric networks of blood vessels, one of them located directly outside of the basement membrane and the other in external theca<sup>(47)</sup>. These capillary networks in an intact follicle, do not penetrate towards the granulosa<sup>(48,49,50)</sup>, so this cell layer remains avascular throughout the follicular development<sup>(51)</sup>.

The establishment of the capillary plexus of internal theca coincides with the period of rapid growth and differentiation of the follicles; it has been proposed that a factor that influences the selection of the dominant follicle, in addition to its response to gonadotropin and estradiol production, is the ability to develop a greater vascular network, It has been proved that the dominant follicles have a greater and better irrigation to subordinate follicles, and the latter presented a rapid degeneration of the vasculature of the theca as part of the process of atresia<sup>(52)</sup>. In this way VEGF and their membrane receptors have shown to have an important role as regulators of angiogenesis of the follicle<sup>(45)</sup> and as protector of the granulosa cells<sup>(17)</sup>.

The VEGF is produced by theca, granulosa and luteal cells. In the follicle, the granulosa cells are the main source of VEGF, which seems to create a gradient with direction towards the basal membrane, by encouraging the contribution of oxygen, nutrients and hormones to granulosa cells<sup>(35,53)</sup>. VEGF can act as a factor of survival for the granulosa cells and thereby suppressing atresia of the antral follicles<sup>(54)</sup>; Greenaway *et al*<sup>(17)</sup> demonstrated that VEGF has a cytoprotector effect,

la vasculatura de la teca como parte del proceso de atresia<sup>(52)</sup>. De esta forma el VEGF y sus receptores de membrana han mostrado tener un papel importante como reguladores de la angiogénesis del folículo<sup>(45)</sup> y como protectores de las células de la granulosa<sup>(17)</sup>.

El VEGF es producido por células de la teca, granulosa y lúteas. En el folículo, las células de la granulosa son las principales productoras de VEGF, lo cual parece crear un gradiente con dirección hacia la membrana basal, favoreciendo el aporte de oxígeno, nutrientes y hormonas a las células de la granulosa<sup>(35,53)</sup>. El VEGF puede actuar como un factor de sobrevivencia para las células de la granulosa y con ello suprimir la atresia de los folículos antrales<sup>(54)</sup>, al respecto Greenaway *et al.*<sup>(17)</sup> demostraron que VEGF ejerce un efecto citoprotector, evitando la apoptosis de células endoteliales y de la granulosa en cultivo. Por otro lado, durante la selección del folículo dominante, los de mayor tamaño y concentración de estradiol (estrógeno-activos) corresponden a los que también tienen una vasta vascularización y una mayor concentración de VEGF en sus compartimientos<sup>(55)</sup>. En ratas inmaduras de 21 días de edad, tratadas con eCG y hCG, la administración de fragmentos transcripcionalmente activos del gen de VEGF, incrementa el número de ovocitos ovulados, el número de folículos antrales grandes y el de folículos preovulatorios, reduciendo así el porcentaje de folículos en atresia<sup>(56,57)</sup>. Resultados similares se reportaron en ratones<sup>(58)</sup>.

Investigaciones con el uso de inhibidores de VEGF en primates y humanos han permitido destacar las funciones más importantes de VEGF<sup>(59)</sup>. El tratamiento con un antagonista de VEGF en ovarios de mono tití reduce el volumen folicular, así como el índice de proliferación de granulosa, teca y células endoteliales de folículos desde el estado secundario temprano hasta el de dominancia. El efecto sobre las células endoteliales se ve reflejado en una reducción de la vasculatura de los folículos tratados con el antagonista de VEGF<sup>(60)</sup>.

Resultados de Quintana *et al.*<sup>(61)</sup> y otros autores<sup>(62,63)</sup> muestran que las gonadotropinas (FSH y LH) y

preventing the apoptosis of endothelial cells and granulosa cells in culture. On the other hand, during the selection of the dominant follicle, the follicles of larger size and concentration of estradiol (active-estrógens) correspond to those who also have a vast vascularisation and a greater concentration of VEGF in their compartments<sup>(55)</sup>. In immature rats of 21 d of age treated with eCG and hCG, the administration of active transcripcional fragments of VEGF gene, increases the number of ovulated oocytes, the number of large antral follicles and the preovulatory follicles, thereby reducing the percentage of follicles in atresia<sup>(56,57)</sup>. Similar results were reported in mice<sup>(58)</sup>.

Use of inhibitors of VEGF in primates and humans have made it possible to highlight the most important functions of VEGF<sup>(59)</sup>. Treatment with a VEGF antagonist in Rhesus Monkey ovaries reduces the follicular volume, as well as the rate of proliferation of granulosa, theca and endothelial follicles cells; since early secondary stage until the dominant follicle. The effect on endothelial cells is reflected in a reduction of follicles vasculature<sup>(60)</sup>.

Quintana *et al.*<sup>(61)</sup> and other authors results<sup>(62,63)</sup>, show that the gonadotropins (FSH and LH) and their homologous: human chorionic gonadotropin (hCG) and equine chorionic gonadotropin (eCG), stimulates the production of VEGF in granulosa cells. Barboni *et al.*<sup>(64)</sup> demonstrated in sows, that treatment with 1,250 UI of eCG increases production of VEGF, as well as the transcription of its gene, in cells of the granulosa of follicles greater to 5 mm in diameter<sup>(65)</sup>. The administration of 1 ng/ml of VEGF to cultures cells from the granulosa cells of follicles of cattle with a diameter of 4 to 8 mm, increases cell proliferation, which was exacerbated when FSH was also added (10 ng/ml)<sup>(66)</sup>.

Little is known about the participation and regulation of the different isoforms of VEGF in the follicular development; the most abundant in all mammals seem to be VEGF120 and VEGF164. It has been proposed that in cells culture of the bovine granulosa, estradiol (1 ng/ml) in combination with progesterone (10 ng/ml) increase the expression of

sus homólogas; la gonadotropina coriónica humana (hCG) y la gonadotropina coriónica equina (eCG), estimulan la producción de VEGF en células de la granulosa. Barboni *et al*<sup>(64)</sup> demostraron en cerdas, que el tratamiento con 1,250 UI eCG incrementa la producción de VEGF, así como la transcripción de su gen en células de la granulosa de folículos mayores de 5 mm de diámetro<sup>(65)</sup>. La administración de 1 ng/ml de VEGF al cultivo de células de la granulosa provenientes de folículos de bovino con un diámetro de 4 a 8 mm, incrementa la proliferación celular, la cual se exacerbó cuando además se adicionó FSH (10 ng/ml)<sup>(66)</sup>.

Se conoce poco sobre la participación y regulación de las diferentes isoformas de VEGF en el desarrollo folicular; las más abundantes en todos los mamíferos parecen ser VEGF120 y VEGF164. Se ha propuesto que en cultivos de células de la granulosa de bovinos, estradiol (1 ng/ml) en combinación con progesterona (10 ng/ml) regulan a la alta la expresión del ARNm de VEGF164 y a la baja el ARNm de VEGF120, mientras que la progesterona (10 ng/ml) sola, regula a la baja el ARNm de VEGF164 y a la alta el ARNm de VEGF120<sup>(67)</sup>. Sin embargo en células de la granulosa de folículos seleccionados (estrógeno dominantes) de bovinos, la expresión de VEGF120 y VEGF164 es mayor que en aquéllos no seleccionados<sup>(68)</sup>. En folículos de ovejas, Rosales *et al*<sup>(69)</sup> reportan la expresión del ARNm de VEGF120, VEGF164 y VEGF205 en granulosa y teca de folículos sanos y atrésicos. La expresión de ARNm de VEGF120 y VEGF164 se redujo con un patrón muy similar conforme avanzó el grado de atresia, siendo en las células de la granulosa, en comparación con la teca donde se observó la menor expresión del ARNm de ambas isoformas. En el caso del ARNm de la isoforma VEGF205, se pudo observar en teca y granulosa de folículos sanos, sin embargo durante la atresia prácticamente dejó de expresarse en las células de la granulosa, y solamente se detectó expresión en células de la teca.

En cuanto a los receptores de membrana para VEGF, se ha demostrado la presencia de ambos receptores en teca y granulosa de folículos

RNAm of VEGF164 and reduce the RNAm of VEGF120, while the progesterone (10 ng/ml) alone, reduce the RNAm of VEGF164 and increase the RNAm of VEGF120<sup>(67)</sup>. However in granulosa cells of selected follicles (estrogen dominants) the expression of VEGF120 and VEGF164 is higher than in those not selected<sup>(68)</sup>. In sheep follicles, Rosales *et al*<sup>(69)</sup> reported the expression of RNAm of VEGF120, VEGF164 and VEGF205 in granulosa and theca cells of healthy and atretic follicles. The expression of RNAm of VEGF120 and VEGF164 was reduced with a very similar pattern as the degree of atresia advanced. The cells of the granulosa, in comparison with the theca, had lower expression of RNAm of both isoforms. In the case of the RNAm of VEGF205 isoform, it was observed in thecas and granulosa of healthy follicles, however during atresia virtually ceased from expressing in the granulosa cells, and was only detected in theca cells.

With regard to VEGF membrane receptors, it has been demonstrated the presence of both receptors on thecas and granulosa cells of bovine dominant follicles, and CL from this species<sup>(35)</sup>. The presence of VEGFR2 in granulosa cells, suggests an autocrine effect of VEGF. The addition of VEGF to the granulosa cells culture prevented its apoptosis, so it is considered that VEGF has a cytoprotector effect in no endothelial cells, as the granulosa<sup>(17)</sup>. In the granulosa cells of selected follicle, expression of VEGFR2 increases in relation with the expression in not selected follicles, whereas VEGFR1 expression did not change between type of follicles (Figure 2)<sup>(68)</sup>. Dominant follicles of bovines, showed that VEGF protein is in greater concentration in granulosa than in theca; however, VEGFR1, is more concentrated in theca than in the granulosa cells, suggesting that this decoy receptor might attract VEGF from the granulosa towards theca<sup>(70)</sup>.

To date the participation of the soluble VEGF receptors in the follicular development of different species is unknown. We have recently demonstrated the presence of the protein of sVEGFR1 and sVEGFR2 in follicular fluid<sup>(70)</sup> and the RNAm of

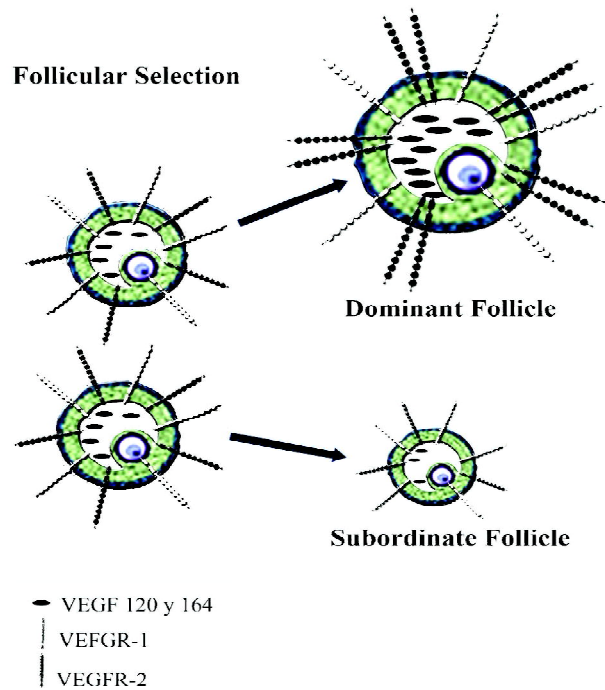
dominantes de bovinos, así como en CL de esta especie<sup>(35)</sup>. La presencia de VEGFR2 en células de la granulosa, sugiere un efecto autocrino de VEGF. La adición de VEGF al cultivo de células de la granulosa evitó su apoptosis, por lo cual se considera que VEGF tiene un efecto citoprotector en células no endoteliales como la granulosa<sup>(17)</sup>. En células de la granulosa de folículos seleccionados, la expresión de VEGFR2 se incrementa en relación con las células de folículos no seleccionados, mientras que la expresión de VEGFR1 no cambió entre tipo de folículos (Figura 2)<sup>(68)</sup>. En folículos dominantes de bovino, se demostró que la proteína de VEGF está en mayor concentración en granulosa que en teca, sin embargo, VEGFR1, se encuentra en mayor concentración en células de la teca que en la granulosa, lo cual sugiere que este receptor considerado anzuelo podría atraer a VEGF desde la granulosa hacia la teca<sup>(70)</sup>.

Hasta la fecha se desconoce la participación que tienen los receptores solubles para VEGF en el desarrollo folicular de las diferentes especies. Recientemente hemos demostrado la presencia de la proteína de sVEGFR1 y sVEGFR2 en líquido folicular<sup>(70)</sup> y el ARNm de ambos receptores solubles en células de folículos sanos y atrésicos. En folículos atrésicos se encontró la mayor concentración relativa de sVEGFR2, mientras que en los folículos sanos, hubo mayor concentración relativa de sVEGFR1 que en los atrésicos. Esto indica que probablemente la pérdida de irrigación que presenta un folículo cuando se vuelve atrésico, es ocasionado por el efecto antiangiogénico que ejerce sVEGFR2 al competir por el ligando con los receptores de membrana<sup>(71)</sup>.

Las evidencias mencionadas, permiten sugerir que VEGF es importante durante la selección del folículo dominante de dos maneras; 1) promoviendo la vasculatura del folículo y 2) como factor de sobrevivencia de las células foliculares, en especial de la granulosa. Respecto a los receptores de membrana, parece ser que al igual que en otros tejidos, VEGF ejerce sus efectos biológicos en el folículo por medio de VEGFR2, sin embargo se requiere más investigación para evaluar el papel de

Figura 2. Representación esquemática de los cambios en la expresión de VEGF y sus receptores durante la selección del folículo dominante

Figure 2. Schematic representation of changes in the expression of VEGF and its receptors during the dominant follicle selection



both soluble receptors in cells of healthy and atretic follicles. The most relative concentration of sVEGFR2 was found in atretic follicles, while in the healthy follicles, there was greater relative concentration of sVEGFR1 than in the atretic. This indicates that the loss of irrigation that presents a follicle when becomes atretic, is probably caused by the anti-angiogenic effects of sVEGFR2 to competing for the ligand membrane receptors<sup>(71)</sup>.

The above evidences can suggest that VEGF is important during the selection of the dominant follicle in two ways; 1) promoting the vasculature of the follicle and 2) as a factor in survival of the follicular cells, especially of the granulosa. With respect to the membrane receptors, it seems that just as in other tissues, VEGF exerts its biological effects in the follicle through VEGFR2, however further research is needed to assess the role of

VEGFR1, VEGFR2, sVEGFR1 y sVEGFR2 en el desarrollo folicular.

*Participación de VEGF en la ovulación*

La ovulación es el proceso mediante el cual el ovocito reinicia la actividad meiótica y es liberado del folículo hacia el oviducto para ser fecundado, para esto se crea un poro en la pared apical del folículo. Este evento implica remodelación y diferenciación de las células foliculares para formar el cuerpo lúteo<sup>(72)</sup>. Para que un folículo sea ovulado debe desarrollarse desde folículo primordial hasta folículo preovulatorio, proceso en el cual el ovocito, las células de la granulosa y células de la teca adquieren características funcionales que permiten llevar a cabo la ovulación<sup>(73)</sup>. La FSH y LH son las principales hormonas encargadas de estimular el crecimiento y la maduración del folículo. La LH es la hormona que desencadena todos los mecanismos de ovulación, entre los que se encuentran la proteólisis de la pared folicular para liberar el ovocito, la activación de la meiosis del ovocito y la luteinización de las células foliculares<sup>(74)</sup>.

La unión de LH a su receptor en la membrana plasmática de las células de la granulosa, desencadena, por medio del adenosin monofosfato cíclico (cAMP) la activación de cinasas activadas por mitógenos (MAPK), también conocidas como cinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1, 2); las cuales a nivel nuclear ocasionan la disminución en la síntesis de E2 y proliferación celular, y el incremento en la síntesis de P4 por modificar la transcripción y traducción de enzimas esteroideogénicas. Otro de los efectos ocasionados por la unión de LH a su receptor son la expansión del cumulus, la estimulación de la ruptura del folículo y la formación del CL<sup>(72-75)</sup>.

Después del pico preovulatorio de LH hay un incremento de la circulación hacia el ovario que se acompaña de vasodilatación e incremento en la permeabilidad vascular en el folículo preovulatorio. Estos cambios vasculares causan edema en la teca interna, lo que provoca una condición edematosa en todo el folículo, la cual persiste a través de la ruptura folicular<sup>(75,76,77)</sup>. El flujo sanguíneo hacia

VEGFR1, VEGFR2, sVEGFR1 and sVEGFR2 in the follicular development.

*Participation of VEGF in ovulation*

Ovulation is the process by which the oocyte restarts the meiotic activity and is released from the follicle to the oviduct to be fertilized, for this a pore in the apical wall of the follicle is created. This event involves remodelling and differentiation of follicular cells to form the corpus luteum<sup>(72)</sup>. For a follicle to be ovulated, it must develop from primordial follicle until preovulatory follicle, process in which the oocyte, the granulosa and theca cells acquire functional characteristics, which allow to carry out the ovulation<sup>(73)</sup>. FSH and LH are the main hormones responsible for stimulating the growth and maturation of the follicle. LH is the hormone that triggers all the mechanisms of ovulation, which include the proteolysis of the follicular wall for the release of the oocyte, activation of the oocyte meiosis and luteinization of follicular cells<sup>(74)</sup>.

The LH bond to its receptor in the plasma membrane of the granulosa cells, triggers, via cyclic adenosine monophosphate (cAMP), the activation of Mitogen-activated protein kinase (MAPK), also known kinases regulated by extracellular signs 1 and 2 (ERK1, 2); which at the nuclear level cause the decrease in the synthesis of E2 and cell proliferation, and the increase in the synthesis of P4 by modifying the transcription and translation of esteroideogenic enzymes. Other effects caused by the bond of LH to its receptor are the expansion of the cumulus, the rupture of the follicle stimulation and CL formation<sup>(72-75)</sup>.

After the preovulatory LH peak, there is an increase in the movement toward the ovary, accompanied by vasodilatation and increased vascular permeability in the preovulatory follicle. These vascular changes cause edema in internal theca, which causes an edematous condition in the follicle, which persists through the follicular rupture<sup>(75,76,77)</sup>. Blood flow to the follicle is reduced at the apex while increases at its base to facilitate follicular rupture<sup>(77)</sup>. Induction of ovulation with LH or hCG increases the release of histamine from the ovary and the concentration of eicosanoids, leukotrienes, platelets

el folículo se reduce en el ápex mientras que se incrementa en la base de éste para facilitar la ruptura folicular<sup>(77)</sup>. La inducción de la ovulación con LH o hCG incrementa la liberación de histamina por parte del ovario y la concentración de eicosanoides, leucotrienos, factor activador de plaquetas y bradiquinas, las cuales están asociadas con los procesos vasculares dentro del folículo<sup>(78)</sup>. Después del pico preovulatorio de LH, las capas celulares del folículo y de la matriz extracelular del ápex folicular se hacen más delgadas y la membrana basal es degradada por proteólisis, así mismo todo el folículo es remodelado por medio de una rápida angiogénesis e infiltración de nuevos vasos sanguíneos, células de la teca y del sistema inmunológico en el antro folicular, mientras que las células foliculares se diferencian en células lúteas<sup>(72)</sup>.

En folículos ovulatorios de yeguas, después de 36 h del tratamiento con hCG hay un incremento en el número de vasos sanguíneos en las tecas<sup>(79)</sup>. Es muy probable que las gonadotropinas, en especial LH, sea la responsable no sólo de desencadenar los procesos fisiológicos, bioquímicos, hormonales y mecánicos que disparan la ovulación, sino también la hormona responsable de modular o regular la angiogénesis en el folículo ovulatorio, para que de alguna manera detenga de manera transitoria la afluencia sanguínea en el folículo al momento de la ovulación, y con ello evitar una probable hemorragia (existen evidencias bibliográficas en diferentes especies que apoyan esta idea).

En folículos de cerdos, el área endotelial y la proliferación endotelial son mayores en folículos preovulatorios en comparación con folículos periovulatorios tempranos (18 h después de hCG). Sin embargo en folículos periovulatorios tardíos (36 h después de hCG) el área endotelial y la tasa de proliferación endotelial se incrementan hasta valores mayores o similares a los observados en los folículos preovulatorios<sup>(46)</sup>.

Los cambios vasculares durante la ovulación, al igual que en otros procesos angiogénicos, parecen estar mediados por el VEGF y sus receptores. En mono Rhesus<sup>(80)</sup> y macacos<sup>(81)</sup> la inyección intra-

activator factor and bradiquinas, which are associated with vascular processes inside the follicle<sup>(78)</sup>. After the preovulatory LH peak, the follicular cells and the extracellular matrix of the follicular apex become thinner, and the basement membrane is degraded by proteolysis, likewise the follicle is remodeled through a rapid angiogenesis and infiltration of new blood vessels, theca and cells of the immune system in the follicular antrum, while the follicular cells differentiate into luteal cells<sup>(72)</sup>.

In mare's ovulatory follicles, there is an increase in the number of blood vessels in the thecas 36 h after treatment with hCG. It is very likely that the gonadotropins, in special LH, is responsible for not only triggering the physiological, biochemical, hormonal and mechanical processes that trigger ovulation, but also the hormone responsible to modulate the angiogenesis in the ovulatory follicle, that somehow stop temporarily the flow of blood in the follicle at the time of ovulation, and thereby avoiding a likely hemorrhage. There is evidence in different species that support this idea. In follicles of pigs, the endothelial area and endothelial proliferation are greater in periovulatory follicles compared with early periovulatory follicles (18 h after hCG). However in late periovulatory follicles (36 h after hCG) the endothelial area and endothelial proliferation rate, increase to values greater or similar to those observed in the preovulatory follicles<sup>(46)</sup>.

Vascular changes during ovulation, as well as in other angiogenic processes, seem to be mediated by VEGF and its receptors. In Rhesus<sup>(80)</sup> and macaques<sup>(81)</sup> the intra-follicular injection of sVGF1 in preovulatory follicles, disrupts ovulation and CL function. In another experiment in which follicular development was induced in prepuber rats with 10 IU eGC and 48 h after 20 IU of hCG, and ovaries were dissected at 0,6,12,18 and 24 h after hCG treatment, could be demonstrated that these hormones cause different responses in the expression of VEGF and its receptors. In the ovaries of these animals, treatment with eCG increased RNAm of VEGF120 VEGF164 and VEGFR1, but not changed the expression of VEGFR2; however hCG has not modified the expression of RNAm of

folicular de sVEGFR1 en folículos preovulatorios, altera la ovulación y la función del CL. En otro experimento en el que se indujo el desarrollo folicular a ratas pre púberes con 10 UI eCG y 48 h después 20 UI de hCG, y se diseccionaron los ovarios 0, 6, 12, 18 y 24 h después del tratamiento con hCG, se pudo demostrar que estas hormonas provocan diferentes respuestas en la expresión de VEGF y sus receptores. En los ovarios de estos animales; el tratamiento con eCG incrementó el ARNm de VEGF120, VEGF164 y VEGFR1, pero no modificó la expresión de VEGFR2; sin embargo hCG no modificó la expresión del ARNm de los tres primeros genes en ninguno de los tiempos postratamiento, mientras que el ARNm de VEGFR2, disminuyó significativamente desde las 12 h de la aplicación de hCG<sup>(82)</sup>. Este resultado es razonable si recordamos que VEGFR2 es el receptor con mayor capacidad de señalización, entonces aun cuando VEGF y VEGFR1 no modifiquen su expresión al acercarse la ovulación, basta que disminuya de manera significativa el receptor con mayor funcionalidad para que ocurra este proceso. Existen otras evidencias al respecto que sustentan lo anterior; la inducción de la ovulación con eCG (1,250 UI) y hCG (750 UI) en cerdas, muestra que alrededor de la ovulación (18 h después de hCG) la proteína de VEGF producida por las células de la granulosa y el área vascular del folículo se reducen en comparación con folículos preovulatorios (60 h de la estimulación con eCG), sin embargo, a las 36 h del tratamiento con hCG, VEGF y el área vascular se incrementa nuevamente<sup>(47)</sup>. En cultivo de células de granulosa luteinizadas de humano, el uso de un antagonista de GnRH reduce la secreción de VEGF por estas células sin afectar la producción de esteroides gonadales<sup>(83)</sup>. En folículos preovulatorios de bovinos, la expresión de ARNm de las isoformas 120, 164 y 188 de VEGF se reduce casi linealmente desde las 4 y hasta las 25 h (cerca de la ovulación) después de la aplicación de GnRH, incrementándose dramáticamente en el CL recién formado (60 h de GnRH). En este mismo trabajo no se observaron cambios en la expresión de VEGFR1 durante las primeras 25 h después de la aplicación de GnRH, pero la expresión de VEGFR2, sí se redujo a este tiempo, y se incrementó en el CL recién formado<sup>(84)</sup>.

the first three genes in any of the post-treatment times, while RNAm of VEGFR2, significantly decreased since 12 h pos hCG treatment<sup>(82)</sup>. This result is congruent if we remember that VEGFR2 is the receptor of major signaling capacity, then, even when VEGF and VEGFR1 did not alter its expression approaching ovulation, the reduction of VEGFR2 expression is enough to prevent bleeding. There is other evidence supporting the above: induction of ovulation with eCG (1,250 IU) and hCG (750 IU) in sows, shows that around ovulation (18 h after hCG) protein of VEGF produced by the granulosa and vascular area of the follicle cells are reduced in comparison with preovulatory follicles (60 h from eCG stimulation); however, at 36 h after treatment with hCG, VEGF and vascular area increases again<sup>(47)</sup>. In culture of human cells of luteinized granulosa, the use of a GnRH antagonist reduces the secretion of VEGF by these cells without affecting the production of gonadal steroids<sup>(83)</sup>. In preovulatory bovine follicles, the RNAm expression of VEGF120, VEGF164 and VEGF188 isoforms is almost linearly reduced since 4 to 25 h (near ovulation) after GnRH application, but its expression dramatically increases in the newly formed CL (60 h from GnRH). In this same work, there was no change in the expression of VEGFR1 during the first 25 h after GnRH application, but the expression of VEGFR2 was reduced at this time, and increased in the newly formed CL<sup>(84)</sup>. A work done by our research group, which compared the expression of RNAm of VEGF120, VEGF164 and receptors VEGFR1, VEGFR2 and sVEGFR1 between dominant follicles of d 6 of the cycle with preovulatory follicles (18 h after treatment with GnRH), revealed that the expression of RNAm of VEGF164, VEGFR-1, VEGFR-2 was reduced significantly in preovulatory follicles, but increased the expression of RNAm of sVEGFR1, which proposes that in cattle when the follicle is approaching to ovulation, there is an antiangiogenic transitional process (greater expression of the soluble receptor than membrane receptors), probably in order to prevent bleeding during ovulation<sup>(85)</sup>.

It seems clear that near ovulation, there is a reduction in angiogenic activity of VEGF and its

En un trabajo realizado por nuestro grupo de investigación, en el que se comparó la expresión del ARNm de VEGF120, VEGF164 y de los receptores VEGFR1, VEGFR2 y sVEGFR1 en folículos dominantes del día 6 del ciclo con folículos preovulatorios (18 h después del tratamiento con GnRH), reveló que la expresión del ARNm de VEGF164, VEGFR-1 y VEGFR-2 disminuyeron de forma significativa en los folículos preovulatorios, pero aumentó la expresión del ARNm de sVEGFR1, con lo cual se propone que en el bovino cuando el folículo se acerca a la ovulación, existe un proceso antiangiogénico transitorio (mayor expresión del receptor soluble que de los receptores de membrana), probablemente con el propósito de evitar una hemorragia durante la ovulación<sup>(85)</sup>.

Parece claro que cerca de la ovulación hay una reducción de la actividad angiogénica de VEGF y sus receptores, que se ve reflejado en una reducción de la formación de vasos sanguíneos. Sin embargo, tan rápido como 35 h en bovinos, 18 h en cerdos o 6 h en roedores después de la ovulación, la angiogénesis se restablece para promover la vasculatura necesaria para la formación del CL (Cuadro 1).

*Participación de VEGF en la formación del CL y la luteólisis*

Después de la ovulación, las células de la teca y células endoteliales penetran hacia la cavidad folicular formando una mezcla de células de la granulosa, teca y endoteliales, entre otras<sup>(28,86)</sup>, que da origen al CL, que es el tejido del organismo que más flujo sanguíneo recibe respecto a su masa<sup>(28)</sup>, en buena medida debido a que está conformado en más del 50 % por células endoteliales<sup>(87)</sup>. Durante la formación y maduración del CL más del 80 % de las células que están proliferando son células endoteliales<sup>(1,28)</sup>.

La angiogénesis durante la formación, maduración y regresión del CL está regulada principalmente por el sistema VEGF<sup>(87,88)</sup>, lo cual ha cobrado importancia en los últimos años<sup>(35,89,90)</sup>. En cerdos la expresión de ARNm y proteína de VEGF en CL es elevada un día después de la ovulación y se reduce para el día 3 post-ovulación, manteniéndose

receptores, that is reflected in a reduction of the formation of blood vessels. However as fast as 35 h in cattle, 18 h in pigs or 6 h in rodents after ovulation, angiogenesis is restored to promote the necessary vasculature for the formation of the CL (Table 1).

*Participation of VEGF in the formation of the CL and luteolysis*

After ovulation, the theca cells and endothelial cells penetrate into the cavity of the follicle, forming a mixture of granulosa cells, theca and endothelial, among others<sup>(28,86)</sup>, giving rise to the CL. The CL is the tissue from the body that more blood flow receives with respect to their mass<sup>(28)</sup>, largely because it is conformed by more than 50 % by endothelial cells<sup>(87)</sup>. During the formation and maturation of the CL, over 80 % of the cells which are proliferating, are endothelial cells<sup>(1,28)</sup>.

Angiogenesis during formation, maturation and regression of the CL is regulated mainly by the VEGF system<sup>(87,88)</sup>, which has gained importance in recent years<sup>(35,89,90)</sup>. In pigs, expression of RNAm and protein of VEGF in CL is high one day after ovulation and is reduced by 3 d post-ovulación, keeping constant until d 14, and significantly decreasing at d 17 of the cycle. In the CL of the 60th day of gestation, the expression of VEGF is significantly greater to the expression detected in the middle and late luteal phase of the

Cuadro 1. Cambios en el área vascular y expresión de VEGF y sus receptores en relación a la ovulación

Table 1. Changes in vascular area and expression of VEGF and its receptors in relation to ovulation

	Type of follicle in relation to ovulation		
	Preovulatory	Ovulatory	Posovulatory
Vascular area	+++	++	++++
VEGF	+++	+	++++
VEGFR-1	+++	+++	+++
VEGFR-2	+++	+	++++

Number of + indicates the number of vascular area or level of expression.



constante hasta día 14 y disminuyendo significativamente el día 17 del ciclo. En el CL del día 60 de gestación, la expresión de VEGF es significativamente mayor a la expresión detectada en la fase lútea media y tardía del ciclo estral<sup>(91,92)</sup>. Resultados similares han sido reportados por Boomyaprakob *et al*<sup>(89)</sup> respecto al ARNm de VEGF en CL de cerdos durante los días 5 al 15 del ciclo estral; además estos autores demuestran que la expresión de ARNm de VEGFR1, se incrementa paulatinamente del día 4 al día 15 del ciclo, mientras que el ARNm de VEGFR2 se mantiene elevado durante los primeros 13 días de iniciado el estro y se reduce significativamente el día 15<sup>(89)</sup>. No obstante, en búfalos, la expresión de ARNm de VEGF y VEGFR2 no presenta cambios importantes durante la formación, maduración y lisis del CL, mientras que el ARNm de VEGFR1, se reduce en forma lineal durante la luteolisis<sup>(93)</sup>. En bovinos el ARNm de VEGF y VEGFR2 es elevado durante la formación del CL (día 3-4 del ciclo estral) y se reduce conforme madura y se acerca la luteolisis, mientras que en ARNm de VEGFR1 no presenta cambios en su expresión a lo largo del ciclo estral<sup>(35)</sup>. Los resultados analizados hasta este momento, sugieren que VEGF y VEGFR2 son los principales encargados de controlar la formación de nuevos vasos sanguíneos durante el desarrollo del CL en cerdos y bovinos, mientras que en búfalos VEGFR1 parece estar más involucrado en la lisis del CL.

El tratamiento intravenoso con un antagonista de VEGF (VEGFtrap 0.25 mg/kg) en la fase lútea temprana y media de macacos, reduce la secreción de progesterona por el CL, e incrementa la secreción de FSH<sup>(81)</sup>. En el mono titi el tratamiento con este mismo antagonista (25 mg/kg) durante la fase lútea media, reduce el peso del ovario, el área del CL e incrementa la actividad de caspasa 3 en comparación con CL de fase lútea media sin tratamiento<sup>(94)</sup>. La inyección intra-luteal de un anticuerpo contra VEGF (8.3 mg/100  $\mu$ l/inyección tres veces por día) en vacas desde el día 1 hasta el día 7 después de la ovulación, reduce la concentración de progesterona en plasma y el volumen del CL, sin embargo no se afecta la expresión de ARNm de VEGF y la de sus receptores de membrana<sup>(95)</sup>. Estos datos sustentan la importancia de VEGF en el desarrollo y mantenimiento de la funcionalidad del CL.

estrous cycle<sup>(91,92)</sup>. Similar results have been reported by Boomyaprakob *et al*<sup>(89)</sup> as regards the RNAm of VEGF in CL pigs during the 5 to 15 d of the estrous cycle; also these authors show that the expression of mRNA of VEGFR1, increases gradually from d 4 to the d 15 of the cycle, whereas mRNA of VEGFR2 remains high during the first 13 d of initiated oestrus and significantly reduces at d 15<sup>(89)</sup>. However, in buffalo, the expression of mRNA of VEGF and VEGFR2 does not present major changes during formation, maturation and lysis of the CL, while VEGFR1 mRNA, is reduced in linear form during luteolysis<sup>(93)</sup>. In cattle VEGF and VEGFR2 mRNA is higher during the formation of the CL (d 3-4 of estrous cycle) and there is a reduction as the CL matures and is approaching the luteolysis, while in VEGFR1 mRNA does not present changes in his expression during the estrous cycle<sup>(35)</sup>. The results analysed so far, suggest that VEGF and VEGFR2 are the main controllers of the formation of new blood vessels during the CL development in pigs and cattle, while in buffalo VEGFR1 seems to be more involved in the lysis of the CL.

Intravenous treatment with a VEGF antagonist (VEGFtrap 0.25 mg/kg) in the early and middle luteal phase of macaques, reduces secretion of progesterone by the CL, and increases the secretion of FSH<sup>(81)</sup>. In the Rhesus monkey treatment with this same antagonist (25 mg/kg) during the middle luteal phase, reduces the weight of the ovary, the CL area and increases the activity of Caspase 3 in comparison with middle luteal phase CL without treatment<sup>(94)</sup>. Intra-luteal injection of a VEGF antibody (8.3 mg/100  $\mu$ l/injection three times a day) in cows from d 1 to 7 after ovulation, reduces the concentration of progesterone in plasma and the volume of the CL, however does not affect the expression of VEGF mRNA and their membrane receptors<sup>(95)</sup>. These data support the importance of VEGF in the development and maintenance of the CL functionality.

With regard to the the soluble receptors sVEGFR1 and sVEGFR2, there is only evidence of the presence of mRNA of sVEGFR1 in sows CL<sup>(96)</sup>, without clarity of their role. Our group's

Con respecto a los receptores solubles sVEGFR1 y sVEGFR2, sólo existe la evidencia de la presencia de ARNm de sVEGFR1 en CL de ciclo estral y de gestación en cerdas<sup>(96)</sup>, sin que se tenga claro cuál es su función. Resultados preliminares de nuestro grupo indican que la expresión de sVEGFR1, no se modifica durante la fase lútea, en tanto que la expresión del ARNm de sVEGFR2, se incrementa en la fase lútea tardía con respecto a la fase lútea temprana<sup>(97)</sup>.

Como se ha establecido, el sistema VEGF es importante para la formación de la red vascular del CL que le permita ser funcional, sin embargo se desconocen los mecanismos que regulan la expresión de VEGF para que pueda estimular la angiogénesis del CL. Si bien es cierto que existen evidencias de la participación de LH como moduladora de la expresión de VEGF durante el desarrollo folicular y del CL<sup>(98-101)</sup>, es ampliamente conocido que VEGF es regulado principalmente por hipoxia<sup>(28)</sup>, ya que durante la ruptura del folículo provocada en la ovulación, hay sangrado y presencia de vasculatura inmadura que la propician<sup>(95)</sup>. En cultivo de células lúteas, la reducción en la tensión de oxígeno de 20 a 3 %, incrementa la expresión de ARNm, y de la proteína de VEGF y HIF-1 $\alpha$  desde las 6 y hasta las 24 h después del tratamiento<sup>(102)</sup>.

La regresión del CL implica una reducción en su tamaño, la cual es acompañada de la muerte de las células que lo forman, incluyendo a las células endoteliales<sup>(103)</sup>, por lo que se considera que existe una angioregresión durante el proceso de luteolisis. En bovinos la lisis inducida del CL con PGF2- $\alpha$ , no reduce la expresión de ARNm de VEGF y VEGFR1 durante las primeras 48 h después del tratamiento, sin embargo la expresión del ARNm de VEGFR2 se reduce paulatinamente desde las 2 h después de la aplicación de PGF2- $\alpha$ <sup>(104)</sup>. Resultados similares se encontraron en ovejas, en los cuales además se muestra que la expresión de VEGF y sus receptores se correlacionan positivamente con la expresión de BS-1 y lectina (marcadores de células endoteliales) durante la lisis inducida del CL<sup>(105)</sup>.

Todo lo anterior sugiere que el sistema VEGF es necesario no sólo para la angiogénesis inicial del

preliminary results indicate that the expression of sVEGFR1 does not change during the luteal phase, whereas the expression of mRNA of sVEGFR2, increases in the late luteal phase with regard to the early luteal phase<sup>(97)</sup>.

As it has been established, the VEGF system is important for the formation of the vascular network of the CL that allows it to be functional; however the mechanisms that regulate the expression of VEGF to stimulate angiogenesis of the CL are unknown. Even when there is evidence that LH is involved in modulation of the expression of VEGF during follicular and CL development<sup>(98-101)</sup>, it is widely known that VEGF is mainly regulated by hypoxia<sup>(28)</sup>. During rupture of the follicle at ovulation, there is bleeding, and presence of immature vasculature favoring hypoxia<sup>(95)</sup>. In luteal cells cultures, the reduction in the tension of oxygen from 20 to 3 %, increases the expression of mRNA and protein of VEGF and HIF-1 $\alpha$  since 6 to 24 h after treatment<sup>(102)</sup>.

The CL regression implies a reduction in its size, which is accompanied by the death of its cells, including the endothelial cells<sup>(103)</sup>, so there is an angioregression during the process of luteolysis. In cattle the lysis induction of CL with PGF2- $\alpha$ , does not reduce the expression of VEGF mRNA and VEGFR1 during the first 48 h after treatment, however expression of mRNA of VEGFR2 is reduced gradually since the 2 h after PGF2- $\alpha$  application<sup>(104)</sup>. Similar results were found in sheep, which also shows that expression of VEGF and its receptor were correlate positively with the expression of BS-1 and lectin (markers of endothelial cells) during CL regression<sup>(105)</sup>.

All the above suggests that the VEGF system is necessary not only for the initial angiogenesis of the CL during its development, but also for the maintenance of its function. In addition, during CL lysis, the VEGF system seems to be destabilized to prevent its action and promote regression of the CL. Table 2 shows changes in the relative expression of VEGF and its receptors during the early, middle, late luteal phase and the regression of the CL.

CL durante su desarrollo, sino también para el mantenimiento de su función. En adición, durante la lisis del CL el sistema VEGF parece ser desestabilizado para evitar su acción y favorecer la regresión del CL. En el Cuadro 2 se muestran los cambios en la expresión relativa de VEGF y sus receptores durante la fase lútea temprana, media, tardía y en la regresión del CL.

**CONCLUSIONES**

Aun cuando falta mucho por conocer sobre la participación del sistema VEGF en el desarrollo de los folículos, la ovulación y la formación del cuerpo lúteo, lo que hasta ahora se conoce permite afirmar que los componentes de este complejo sistema, deben mantener un fino equilibrio para asegurar la integridad y funcionamiento de las estructuras ováricas. Las evidencias indican que en los procesos ováricos mencionados, las mayores modificaciones en la expresión del sistema VEGF, ocurren en los receptores de membrana y solubles, más que en el ligando. Adicionalmente, es necesario seguir trabajando para conocer con mayor profundidad los mecanismos por los cuales los diferentes compartimentos foliculares y el CL regulan la expresión de los componentes del sistema VEGF.

**AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado #24735.

**LITERATURA CITADA**

1. Tamanini C, De Ambrogi M. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reprod Domest Anim* 2004;39:206-216.
2. Kaczmarek MM, Schams D, Ziecik AJ. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology - an overview. *Reprod Biol* 2005;5:111-136.
3. Clark LJ, Irving-Rodgers HF, Dharmarajan AM, Rodgers RJ. Theca interna: the other side of bovine follicular atresia. *Biol Reprod* 2004;71:1071-1078.
4. Feranil J, Isobe N, Nakao T. Apoptosis in the antral follicles of swamp buffalo and cattle ovary: TUNEL and caspase-3 histochemistry. *Reprod Domest Anim* 2005;40:111-116.

Cuadro 2. Cambios en la expresión de VEGF y sus receptores durante el desarrollo y regresión del CL

Table 2. Changes in the expression of VEGF and its receptors during development and regression of the CL

	Phase of corpus luteum development			
	Early	Medium	Late	Regression
VEGF	++++	++	++	++
VEGFR1	++	++	+++	++
VEGFR2	++++	++++	+++	+
sVEGFR1	++	++	++	++
sVEGFR2	++	++	+++	+++

Number of + indicates the level of expression.

**CONCLUSIONS**

Even though much remains to learn about the participation of the VEGF system in the development of follicles, ovulation and the formation of the corpus luteum, which hitherto known allows affirm that the components of this complex system, must maintain a fine balance to ensure the integrity and operation of the ovarian structures. Evidence indicates that in the ovarian processes already mentioned, major changes in the expression of VEGF system occur in the membrane receptors and soluble receptors, rather than on the ligand. In addition, it is necessary to continue to learn in greater depth the mechanisms by which different follicular compartments and the CL regulate the expression of VEGF system components.

**ACKNOWLEDGMENTS**

The National Council of science and technology for the given # 24735 support.

*End of english version*

5. Acosta TJ, Hayashi KG, Ohtani M, Miyamoto A. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction* 2003;125:759-767.
6. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in

- regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280:1358-1366.
7. Redmer DA, Doraiswamy V, Bortnem BJ, Fisher K, Jablonka-Shariff A, Grazul-Bilska AT, Reynolds LP. Evidence for a role of capillary pericytes in vascular growth of the developing ovine corpus luteum. *Biol Reprod* 2001;65:879-889.
  8. Sallinen H, Anttila M, Narvainen J, Koponen J, Hamalainen K, Kholova I, Heikura T, *et al.* Antiangiogenic gene therapy with soluble VEGFR-1, -2, and -3 reduces the growth of solid human ovarian carcinoma in mice. *Mol Ther* 2009;17:278-284.
  9. Jussila L, Alitalo K. Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol Rev* 2002;82:673-700.
  10. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997;386:671-674.
  11. Abulafia O, Sherer DM. Angiogenesis of the ovary. *Am J Obstet Gynecol* 2000;(1 Pt 1):240-246.
  12. Hellström M, Gerhardt H, Kalén M, Li X, Eriksson U, Wolburg H, Betsholtz C. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol* 2001;153:543-553.
  13. Miller DL, Ortega S, Bashayan O, Basch R, Basilico C. Compensation by fibroblast growth factor 1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice. *Mol Cell Biol* 2000;20:2260-2268.
  14. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161:851-858.
  15. Vieira JM, Ruhrberg C, Schwarz Q. VEGF receptor signaling in vertebrate development. *Organogenesis* 2010;6:97-106.
  16. Petrova TV, Makinen T, Alitalo K. Signaling via vascular endothelial growth factor receptors. *Exp Cell Res* 1999;253:117-130.
  17. Greenaway J, Connor k, Pedersen H, Coomber B, Lamarre J, Petrik J. Vascular endothelial growth factor and its receptor, Flk-1/KDR, are cytoprotective in the extravascular compartment of the ovarian follicle. *Endocrinology* 2004;145:2896-2905.
  18. Augustin PD. Vascular morphogenesis in the ovary. *Bailliere's Clinical Obstet Gynecol*;2000;(14):867-882.
  19. Espinosa CR, Rosado GA. Angiogénesis en la fisiología reproductiva. Desarrollo folicular, formación y mantenimiento del cuerpo lúteo. *Ginecol Obstet Méx* 2002;70:17-27.
  20. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*. 1999;3:9-22.
  21. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997;18:4-25.
  22. Reynolds LP, Redmer DA. Expression of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in the ovary. *J Anim Sci* 1998;76:1671-1681.
  23. Fierro IM, Kutok JL, Serhan CN. Novel lipid mediator regulators of endothelial cell proliferation and migration: aspirin-triggered-15R-lipoxin A(4) and lipoxin A(4). *J Pharmacol Exp Ther* 2002;300:385-392.
  24. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1994;269:26988-26995.
  25. Zeng H, Dvorak HF, Mukhopadhyay D. Vascular permeability factor (VPF)/vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-1 down-modulates VPF/VEGF receptor-2-mediated endothelial cell proliferation, but not migration, through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways. *J Biol Chem* 2001;276:26969-26979.
  26. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1998;273:13313-13316.
  27. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 1998;273:30336-30343.
  28. Fraser HM, Wulff C. Angiogenesis in the corpus luteum. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;10:1:88.
  29. Lee M, Hwang JT, Lee HJ, Jung SN, Kang I, Chi SG, Kim SS, Ha J. AMP-activated protein kinase activity is critical for hypoxia-inducible factor-1 transcriptional activity and its target gene expression under hypoxic conditions in DU145 cells. *J Biol Chem* 2003;278:39653-39661.
  30. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994;265:1582-1584.
  31. Stepien HM, Kolomecki K, Pasięka Z, Komorowski J, Stepien T, Kuzdak K. Angiogenesis of endocrine gland tumours—new molecular targets in diagnostics and therapy. *Eur J Endocrinol* 2002;146:143-51.
  32. Huss WJ, Hanrahan CF, Barrios RJ, Simons JW, Greenberg NM. Angiogenesis and prostate cancer: identification of a molecular progression switch. *Cancer Res* 2001;61:2736-2743.
  33. Jia H, Jezequel S, Löhr M, Shaikh S, Davis D, Soker S, Selwood D, Zachary I. Peptides encoded by exon 6 of VEGF inhibit endothelial cell biological responses and angiogenesis induced by VEGF. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;283:164-173.
  34. Otani N, Minami S, Yamoto M, Shikone T, Otani H, Nishiyama R, Otani T, Nakano R. The vascular endothelial growth factor/fms-like tyrosine kinase system in human ovary during the menstrual cycle and early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3845-3851.
  35. Berisha B, Schams D, Kosmann M, Amselgruber W, Einspanier R. Expression and tissue concentration of vascular endothelial growth factor, its receptors, and localization in the bovine corpus luteum during estrous cycle and pregnancy. *Biol Reprod* 2000;63:1106-1114.
  36. Ferrara N. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. *Endocrine Reviews* 2004;25:581-611.
  37. Elias AP, Dias S. Microenvironment changes (in pH) affect VEGF alternative splicing. *Cancer Microenviron* 2008;1:131-139.
  38. de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992;255:989-991.
  39. Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 2001;114:853-865.
  40. Sallinen H, Anttila M, Narvainen J, Koponen J, Hamalainen K, Kholova I, Heikura T, *et al.* Antiangiogenic gene therapy with soluble VEGFR-1, -2, and -3 reduces the growth of solid human ovarian carcinoma in mice. *Mol Ther* 2009;17:278-284.

## IMPORTANCIA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR

41. Evans JLH, Ireland ME, Winn P, Lonergan GW, Smith PM, Coussens, Ireland JJ. Identification of genes involved in apoptosis and dominant follicle development during follicular waves in cattle. *Biol Reprod* 2004;70:1475-1484.
42. Webb R, Campbell BK, Garverick HA, Gong JG, Gutierrez CG, Armstrong DG. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. *Reproduction in Domestic Ruminants IV. J Reprod Fertil* 1999;54(Suppl 1):33-48.
43. Mihm M, Austin EJ. The final stages of dominant follicle selection in cattle. *Domest Anim Endocrinol* 2002;23:155-166.
44. Ireland JJ, Mihm M, Austin E, Diskin MG, Roche JF. Historical perspective of turnover of dominant follicles during the bovine estrous cycle: key concepts, studies, advancements, and terms. *J Dairy Sci* 2000;83:1648-1658.
45. Wulff C, Wiegand SJ, Saunders PT, Scobie GA, Fraser HM. Angiogenesis during follicular development in the primate and its inhibition by treatment with truncated Flt-1-Fc (vascular endothelial growth factor Trap(A40)). *Endocrinology* 2001;142:3244-3254.
46. Martelli A, Bernabò N, Berardinelli P, Russo V, Rinaldi C, Di Giacinto O, Mauro A, Barboni B. Vascular supply as a discriminating factor for pig preantral follicle selection. *Reproduction* 2009;137:45-58.
47. Martelli A, Berardinelli P, Russo V, Mauro A, Bernabò N, Gioia L, Mattioli M, Barboni B. Spatio-temporal analysis of vascular endothelial growth factor expression and blood vessel remodeling in pig ovarian follicles during the periovulatory period. *J Mol Endocrinol* 2006;36:107-119.
48. Goede V, Schmidt T, Kimmina S, Kozian D, Augustin HG. Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. *Lab Invest* 1998;78:1385-1394.
49. Tempel-Brami C, Neeman M. Non-invasive analysis of rat ovarian angiogenesis by MRI. *Mol Cell Endocrinol* 2002;187:19-22.
50. Wulff C, Wilson H, Wiegand SJ, Rudge JS, Fraser HM. Prevention of thecal angiogenesis, antral follicular growth, and ovulation in the primate by treatment with vascular endothelial growth factor Trap R1R2. *Endocrinology* 2002;143:2797-2807.
51. Tamanini C, De Ambrogio M. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reprod Domest Anim* 2004;39:206-216.
52. Macchiarelli G, Jiang JY, Nottola SA, Sato E. Morphological patterns of angiogenesis in ovarian follicle capillary networks. A scanning electron microscopy study of corrosion cast. *Microsc Res Tech* 2006;69:459-468.
53. Greenaway J, Gentry PA, Feige JJ, LaMarre J, Petrik JJ. Thrombospondin and vascular endothelial growth factor are cyclically expressed in an inverse pattern during bovine ovarian follicle development. *Biol Reprod* 2005;72:1071-1078.
54. Shimizu T, Jiang JY, Iijima K, Miyabayashi K, Ogawa Y, Sasada H, Sato E. Induction of follicular development by direct single injection of vascular endothelial growth factor gene fragments into the ovary of miniature gilts. *Biol Reprod* 2003;69:1388-1393.
55. Grazul-Bilska AT, Navanukraw C, Johnson ML, Vonnahme KA, Ford SP, Reynolds LP, Redmer DA. Vascularity and expression of angiogenic factors in bovine dominant follicles of the first follicular wave. *J Anim Sci* 2007;85:1914-1922.
56. Shimizu T, Iijima K, Ogawa Y, Miyazaki H, Sasada H, Sato E. Gene injections of vascular endothelial growth factor and growth differentiation factor-9 stimulate ovarian follicular development in immature female rats. *Fertil Steril* 2008;89(Suppl 5):1563-1570.
57. Shimizu T, Iijima K, Miyabayashi K, Ogawa Y, Miyazaki H, Sasada H, Sato E. Effect of direct ovarian injection of vascular endothelial growth factor gene fragments on follicular development in immature female rats. *Reproduction* 2007;134:677-682.
58. Quintana R, Kopcow L, Sueldo C, Marconi G, Rueda NG, Barañao RI. Direct injection of vascular endothelial growth factor into the ovary of mice promotes follicular development. *Fertil Steril* 2004;82(Suppl 3):1101-1105.
59. Zimmermann RC, Xiao E, Bohlen P, Ferin M. Administration of antivascular endothelial growth factor receptor 2 antibody in the early follicular phase delays follicular selection and development in the rhesus monkey. *Endocrinology* 2002;143:2496-2502.
60. Taylor PD, Wilson H, Hillier SG, Wiegand SJ, Fraser HM. Effects of inhibition of vascular endothelial growth factor at time of selection on follicular angiogenesis, expansion, development and atresia in the marmoset. *Mol Hum Reprod* 2007;13:729-736.
61. Quintana R, Kopcow L, Marconi G, Sueldo C, Speranza G, Barañao RI. Relationship of ovarian stimulation response with vascular endothelial growth factor and degree of granulosa cell apoptosis. *Hum Reprod* 2001;16:1814-1818.
62. Redmer DA, Dai Y, Li J, Charnock-Jones DS, Smith SK, Reynolds LP, Moor RM. Characterization and expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the ovine corpus luteum. *J Reprod Fertil* 1996;108:157-165.
63. Neulen J, Raczek S, Pogorzelski M, Grunwald K, Yeo TK, Dvorak HF, Weich HA, Breckwoldt M. Secretion of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor from human luteinized granulosa cells is human chorionic gonadotrophin dependent. *Mol Hum Reprod* 1998;4:203-206.
64. Barboni B, Turriani M, Galeati G, Spinaci M, Bacci ML, Forni M, Mattioli M. Vascular endothelial growth factor production in growing pig antral follicles. *Biol Reprod* 2000;63(3):858-64.
65. Mattioli M, Barboni B, Turriani M, Galeati G, Zannoni A, Castellani G, Berardinelli P, Scapolo PA. Follicle activation involves vascular endothelial growth factor production and increased blood vessel extension. *Biol Reprod* 2001;65:1014-1019.
66. Doyle LK, Walker CA, Donadeu FX. VEGF modulates the effects of gonadotropins in granulosa cells. *Domest Anim Endocrinol* 2010;38:127-137.
67. Shimizu T, Miyamoto A. Progesterone induces the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) 120 and Flk-1, its receptor, in bovine granulosa cells. *Anim Reprod Sci* 2007;102:228-237.
68. Shimizu T, Jayawardana BC, Tetsuka M, Miyamoto A. 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. *J Reprod Dev* 2007;53:105-112.
69. Rosales-Torres AM, Alonso I, Vergara M, Romano MC, Castillo-Juárez H, Ávalos A, Rosado A, Gutiérrez CG. Vascular endothelial growth factor isoforms 120, 164 and 205 are reduced with atresia in ovarian follicles of sheep. *Anim Reprod Sci* 2010;122:111-117.
70. Pinzón EC, Vergara M, Gutiérrez CG, Fierro F, Rosales AF. Factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) y sus receptores Flk1, Flt1, sFlk1 y sFlt1 en folículos dominantes de

- bovinos [resumen]. Reunión Anual Academia de Investigación en Biología de la Reproducción. Universidad Veracruzana. México. 2010:25.
71. Macías RV, Vergara M, Gutiérrez CG, Fierro F, Rosales AM. Identificación de RNAm de los receptores solubles para el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en células foliculares de bovinos [resumen]. Reunión Anual Academia de Investigación en Biología de la Reproducción. Universidad Veracruzana. México. 2010;22.
  72. Russell DL, Robker RL. Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. *Hum Reprod Update* 2007;13:289-312.
  73. Richards JS, Russell DL, Ochsner S, Hsieh M, Doyle KH, Falender AE, Lo YK, Sharma SC. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Recent Prog Horm Res* 2002;57:195-220.
  74. Duggavathi R, Murphy BD. Development. Ovulation signals. *Science* 2009;324:890-891.
  75. Espey LL. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biol Reprod* 1994;50:233-238.
  76. Espey LL. Ovulation as an inflammatory reaction—a hypothesis. *Biol Reprod* 1980;22:73-106.
  77. Acosta TJ, Miyamoto A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Anim Reprod Sci* 2004;82-83:127-140.
  78. Gerdes U, Gáfvels M, Bergh A, Cajander S. Localized increases in ovarian vascular permeability and leucocyte accumulation after induced ovulation in rabbits. *J Reprod Fertil* 1992;95:539-550.
  79. Kerban A, Doré M, Sirois J. Characterization of cellular and vascular changes in equine follicles during hCG-induced ovulation. *J Reprod Fertil* 1999;117:115-123.
  80. Hazzard TM, Xu F, Stouffer RL. Injection of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 into the preovulatory follicle disrupts ovulation and subsequent luteal function in rhesus monkeys. *Biol Reprod* 2002;67:1305-1312.
  81. Fraser HM, Wilson H, Morris KD, Swanston I, Wiegand SJ. Vascular endothelial growth factor Trap suppresses ovarian function at all stages of the luteal phase in the macaque. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:5811-5118.
  82. Miyabayashi K, Shimizu T, Kawachi C, Sasada H, Sato E. Changes of mRNA expression of vascular endothelial growth factor, angiopoietins and their receptors during the periovulatory period in eCG/hCG-treated immature female rats. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 2005;303:590-597.
  83. Asimakopoulos B, Nikolettos N, Nehls B, Diedrich K, Al-Hasani S, Metzen E. Gonadotropin-releasing hormone antagonists do not influence the secretion of steroid hormones but affect the secretion of vascular endothelial growth factor from human granulosa luteinized cell cultures. *Fertil Steril* 2006;86:636-641.
  84. Berisha B, Steffl M, Welter H, Kliem H, Meyer HH, Schams D, Amselgruber W. Effect of the luteinizing hormone surge on regulation of vascular endothelial growth factor and extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors in bovine follicles. *Reprod Fertil Dev* 2008;20:258-268.
  85. Méndez HJ, Vergara OM, Fierro FF, Gutiérrez CG, Rosales AM. Expresión del VEGF y sus receptores en folículos dominantes de bovino y su modificación por la aplicación de líquido folicular. Reunión Anual Academia de Investigación en Biología de la Reproducción. Universidad Veracruzana. 2010;300-309.
  86. Fraser HM, Lunn SF. Regulation and manipulation of angiogenesis in the primate corpus luteum. *Reproduction* 2001;121:355-362.
  87. Miyamoto A, Shirasuna K, Sasahara K. Local regulation of corpus luteum development and regression in the cow: Impact of angiogenic and vasoactive factors. *Domest Anim Endocrinol* 2009;37:159-169.
  88. Robinson RS, Woad KJ, Hammond AJ, Laird M, Hunter MG, Mann GE. Focus on vascular function in female reproduction angiogenesis and vascular function in the ovary. *Reproduction* 2009;138:869-881.
  89. Boonyaprakob U, Gadsby JE, Hedgpeth V, Routh P, Almond GW. Expression and localization of vascular endothelial growth factor and its receptors in pig corpora lutea during the oestrous cycle. *Reproduction* 2003;126:393-405.
  90. Galeati G, Forni M, Spinaci M, Zannoni A, Govoni N, Ribeiro LA, Seren E, Tamanini C. Fasting influences steroidogenesis, vascular endothelial growth factor (VEGF) levels and mRNAs expression for VEGF, VEGF receptor type 2 (VEGFR-2), endothelin-1 (ET-1), endothelin receptor type A (ET-A) and endothelin converting enzyme-1 (ECE-1) in newly formed pig corpora lutea. *Domest Anim Endocrinol* 2005;28:272-284.
  91. Ribeiro LA, Turba ME, Zannoni A, Bacci ML, Forni M. Gelatinases, endonuclease and vascular endothelial growth factor during development and regression of swine luteal tissue. *BMC Dev Biol* 2006;6:58.
  92. Ribeiro LA, Turba ME, Bernardini C, Zannoni A, Bacci ML, Forni M. Matrix metalloproteinases -2 and -9 in swine luteal tissue angiogenesis and angioregression. *Vet Res Commun* 2007;31(Suppl 1):193-196.
  93. Papa PC, Moura CE, Artoni LP, Fátima LA, Campos DB, Marques JE Jr, Baruselli PS, *et al.* VEGF system expression in different stages of estrous cycle in the corpus luteum of non-treated and superovulated water buffalo. *Domest Anim Endocrinol* 2007;33:379-389.
  94. Fraser HM, Wilson H, Wulff C, Rudge JS, Wiegand SJ. Administration of vascular endothelial growth factor Trap during the 'post-angiogenic' period of the luteal phase causes rapid functional luteolysis and selective endothelial cell death in the marmoset. *Reproduction* 2006;132:589-600.
  95. Yamashita H, Kamada D, Shirasuna K, Matsui M, Shimizu T, Kida K, Berisha B, Schams D, Miyamoto A. Effect of local neutralization of basic fibroblast growth factor or vascular endothelial growth factor by a specific antibody on the development of the corpus luteum in the cow. *Mol Reprod Dev* 2008;75:1449-156.
  96. Kaczmarek MM, Kiewisz J, Schams D, Ziecik AJ. Expression of VEGF-receptor system in conceptus during peri-implantation period and endometrial and luteal expression of soluble VEGFR-1 in the pig. *Theriogenology* 2009;71:1298-306.
  97. Macías VR1, Guzmán SA, Vergara OM, Fierro FF, Gutiérrez CG, Rosales-Torres A. Expresión de las isoformas VEGF120a y VEGF164a y sus receptores de membrana y solubles en cuerpo lúteo de bovino. [Aceptado para su publicación] Reunión de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción. Juriquilla, Qro, México.
  98. Taylor PD, Hillier SG, Fraser HM. Effects of GnRH antagonist treatment on follicular development and angiogenesis in the primate ovary. *J Endocrinol* 2004;183:1-17.

## IMPORTANCIA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR

99. Duncan WC, van den Driesche S, Fraser HM. Inhibition of vascular endothelial growth factor in the primate ovary up-regulates hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in the follicle and corpus luteum. *Endocrinology* 2008;149:3313-320.
100. Neulen J, Yan Z, Raczek S, Weindel K, Keck C, Weich HA, Marmé D, Breckwoldt M. Human chorionic gonadotropin-dependent expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in human granulosa cells: importance in ovarian hyperstimulation syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:1967-1971.
101. Hazzard TM, Molskness TA, Chaffin CL, Stouffer RL. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietin regulation by gonadotrophin and steroids in macaque granulosa cells during the peri-ovulatory interval. *Mol Hum Reprod* 1999;5:1115-1121.
102. Nishimura R, Okuda K. Hypoxia is important for establishing vascularization during corpus luteum formation in cattle. *J Reprod Dev* 2010;56:110-116.
103. Rosales AM, Guzmán A. Apoptosis in follicular atresia and luteal regression. Review. *Téc Pecu Méx* 2008;46:159-182.
104. Neuvians TP, Berisha B, Schams D. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor (FGF) expression during induced luteolysis in the bovine corpus luteum. *Mol Reprod Dev* 2004;67:389-395.
105. Vonnahme KA, Redmer DA, Borowczyk E, Bilski JJ, Luther JS, Johnson ML, Reynolds LP, Grazul-Bilska AT. Vascular composition, apoptosis, and expression of angiogenic factors in the corpus luteum during prostaglandin F $_{2\alpha}$ -induced regression in sheep. *Reproduction* 2006;131:1115-1126.