



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00099
Matricula: 2173805726

Efecto de los niveles de oxígeno(O₂) en la expresión del ARNm de los componentes angiogénicos y antiangiogénicos del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) en cultivo de células de la granulosa de folículos de bovinos.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 12 del mes de diciembre del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. FRANCISCO FIERRO FIERRO
- DRA. MARIA DEL ROSARIO TARRAGO CASTELLANOS
- DRA. MARTA CATALINA ROMANO PARDO
- DRA. CYNDI GABRIELA HERNANDEZ CORONADO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
12 DIC 2019
A 3 A
MATRICULA: 2173805726



JAHDAI HERNANDEZ MORALES
ALUMNA

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

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL
DE: JAHDAI HERNANDEZ MORALES

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

Aprobar

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

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

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

[Signature]
DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

[Signature]
DR. FRANCISCO FIERRO FIERRO

VOCAL

[Signature]
DRA. MARIA DEL ROSARIO TARRAGO CASTELLANOS

VOCAL

[Signature]
DRA. MARTA CATALINA ROMANO PARDO

SECRETARIA

[Signature]
DRA. CYNDI GABRIELA HERNANDEZ CORONADO



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

**UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL**

**Efecto de los niveles de oxígeno(O₂) en la expresión del
ARNm de los componentes angiogénicos y antiangiogénicos
del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF)
en cultivo de células de la granulosa de
folículos de bovinos**

T E S I S

Para obtener el grado de
Maestro(a) en Biología de la Reproducción Animal

PRESENTA:

Jahdai Hernández Morales

COMITÉ TUTORAL

Director:

Dra. Ana María Rosales Torres

Asesor:

Dr. Adrián Guzmán Sánchez

Asesor:

Dr. Francisco Fierro Fierro

CIUDAD DE MÉXICO, DICIEMBRE DEL 2019

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR:

Dra. Ana María Rosales Torres

Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción, Departamento de Producción
Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

Correo electrónico: anamexico@gmail.com

ASESORES:

Dr. Adrián Guzmán Sánchez

Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción, Departamento de Producción
Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

Correo electrónico: aguzman051181@gmail.com

Dr. Francisco Fierro Fierro

Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad
Iztapalapa

Correo electrónico: degfff@yahoo.com

JURADO DE EXAMEN

Dr. Francisco Fierro Fierro

Departamento de Biotecnología

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Correo electrónico: degfff@yahoo.com

Dra. Cyndi Gabriela Hernández Coronado

Investigador, Universidad Autónoma de México

Correo electrónico: cyndibash87@gmail.com

Dra. Marta Catalina Romano Pardo

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencia

CINVESTAV-IPN

Correo electrónico: mromano@fisio.cinvestav.mx

Dra. María Del Rosario Tarragó

Departamento de Biología de la Reproducción

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Correo electrónico: mrtc@xanum.uam.mx

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Bioquímica de la Reproducción, perteneciente al Departamento de Producción Agrícola y Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

Este proyecto contó con el financiamiento del laboratorio antes mencionado de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

El programa de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrado de Excelencia del CONACyT (PNPC) Registro 003797.

Durante el trabajo realizado en el programa de Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa recibí una beca otorgada por el CONACyT, con número de becario/CVU 638445 /869023 durante el periodo 2017-2019.

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: **Efecto de los niveles de oxígeno (O₂) en la expresión del ARNm de los componentes angiogénicos y antiangiogénicos del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) en cultivo de células de la granulosa de folículos de bovinos** con fecha 12 de diciembre del 2019



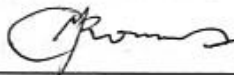
PRESIDENTE

Dr. Francisco Fierro Fierro



SECRETARIO

Dra. Cyndi Gabriela Hernández Coronado



VOCAL

Dra. Marta Catalina Romano Pardo



VOCAL

Dra. María del Rosario Tarragó Castellanos

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a:

Dios

Mis Padres **Simón Morales Fierro** y **Teresa Romero Reyes**, mis viejitos, gracias por el amor, los valores, los sacrificios, los consejos y el apoyo incondicional que me han brindado, son mi motivación para superarme y lograr mis metas.

El amor de mi vida, **Mazahiko Morales Molina** por estar a mi lado desde hace 12 años dándome tu amor, apoyo y comprensión, sin duda no hubiera cumplido esta meta sin tu ayuda. Gracias por impulsarme a luchar por mis sueños, hacer de mí una mejor persona y llenarme de momentos felices, te amo.

Mi hermosa familia; mis tíos **Madaid, Sarai, Orfa** y **Daniel** por su apoyo y consejos, por ser una inspiración para seguir superándome. A mi prima **Sinahi Saavedra Morales** por su apoyo y los buenos momentos que me brindaba cada día, después de un día difícil en el laboratorio

Mi mentor, **Dr. Paulino Sánchez Santillán**, de ser mi director de tesis de licenciatura paso a ser un amigo y consejero, gracias por creer en mí y por impulsarme a crecer profesionalmente, por motivarme a ser mejor persona y profesionalista.

A todos ustedes, les dedico este trabajo de dos años llenos de conocimientos y satisfacciones, muchas Gracias

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma Metropolitana** por abrirme las puertas y brindarme la oportunidad de seguir creciendo personal y profesionalmente.

A la **Dra. Ana María Rosales Torres** por su dirección durante este proyecto y por abrirme las puertas en su equipo de investigación. Muchas gracias por creer en mí y apoyarme a lograr mis metas. Se convirtió en un ejemplo a seguir en muchos aspectos.

Al **Dr. Adrián Sánchez Guzmán**, por sus consejos y por todos los conocimientos proporcionados durante esta etapa de mi vida profesional, sin duda una mente brillante. Sin su ayuda no hubiera aprovechado al máximo los resultados obtenidos.

Al **Dr. Francisco Fierro Fierro** por sus consejos, aportaciones y primordial participación en la revisión de la presente tesis.

A la **Dra. Cyndi** y **Dra. Diana** por ser parte fundamental de mi formación como maestra, por ser amigas y confidentes. Gracias por su tiempo dedicado y ser parte fundamental del éxito de este trabajo, siempre estarán en mi corazón.

A mis amigos y compañeros de laboratorio **Zaire** y **David**, gracias por su apoyo y entrega en este proyecto por compartir conmigo las horas de arduo trabajo pero también las horas de risas. Sobre todo gracias por brindarme su valiosa amistad, los quiero mucho.

A mis compañeros y amigos de maestría con quienes compartí grandes momentos de aprendizaje, por su cariño y apoyo en los momentos difíciles lejos de mi familia.

A la **Dra. Edith Arenas Ríos** por su apoyo en la coordinación del posgrado y a todos los miembros de la comisión de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal.

A mis sinodales, **Dra. Marta Catalina Romano Pardo** y **Dra. María del Rosario Tarragó** Castellanos por su tiempo y dedicación a la revisión del presente trabajo

Al **CONACYT** por la beca otorgada, **muchas gracias**.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS.....	10
ÍNDICE DE FIGURA.....	11
ABREVIATURAS	12
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. ANTECEDENTES.....	6
2.1 Anatomía y Fisiología del Folículo ovárico.....	6
2.1.1 Origen embrionario de los ovarios	6
2.1.2 Estructura del ovario.....	6
2.1.3 Desarrollo Folicular... ..	7
2.1.3.1 Reclutamiento	7
2.1.3.2 Selección y dominancia	7
2.3 Células de la Granulosa	8
2.4 Irrigación sanguínea de los folículos.....	10
2.5 Angiogénesis y regulación.....	11
2.6 Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).....	12
2.7 Factores de Corte y empalme y las enzimas que los fosforilan.....	13
2.8 Mecanismos de Acción de VEGF	16
2.9 VEGF y función ovárica.....	19
2.10 Regulación de la expresión de VEGF	20
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
3.1 Pregunta de Investigación	22
IV. OBJETIVO GENERAL.....	23
4.1 Objetivos Particulares.....	23
V. HIPÓTESIS.....	24
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	25
6.1 Diseño Experimental	25
6.2 Obtención de muestras biológicas.....	25
6.3 Obtención y aislamiento de células de la granulosa de bovino	27
6.4 Cultivos de células de la granulosa.....	28
6.5 Tratamientos con Oxígeno (O ₂)	28

6.6	Extracción de ARN y síntesis de ADNc de células de la granulosa	29
6.7	Expresión de las isoformas y receptores de VEGF, los factores de corte y empalme y las enzimas que los fosforilan SRSF1/SRPK1 y SRSF6/CLK1	29
6.8	Análisis Estadístico	32
VII.	RESULTADOS	33
VIII.	DISCUSIÓN	38
IX.	CONCLUSIÓN	47
X.	BIBLIOGRAFIA	48

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Suplementos del medio cultivo McCoy's 5a modificado con bicarbonato	25
Cuadro 2. Secuencias de cebadores y sondas TaqMan específicas para VEGF120, VEGF120b, VEGF164, VEGF164b, SRPK1, SRSF1, CLK1, SRSF6, VEGFR1, VEGFR2, sVEGFR1 y sVEGFR2 de bovinos.....	30
Cuadro 3. Expresión del ARNm de la isoforma VEGF164b en riñón, retina cotiledones y glándula mamaria de bovino	34
Cuadro 4. Correlación entre ARNm de VEGF120, VEGF164 con el complejo SRSF1/SRPK1 y el ARNm de VEGF120b y VEGF164b con el complejo SRSF6/CLK1 en células de la granulosa de bovino cultivadas a diferentes concentraciones de oxígeno, 5% CO ₂ , balance de nitrógeno a las 48 h.....	37

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1. Diseño experimental para alcanzar los objetivos planteados.....	25
Figura 2. Expresión del ARNm de las isoformas VEGF120, VEGF164, VEGF120b y VEGF164b en células de la granulosa de bovino cultivadas a diferentes concentraciones de oxígeno, 5% CO ₂ , balance de nitrógeno a las 48 h.....	34
Figura 3. Expresión del ARNm de los factores de corte y empalme SRSF1 y SRSF6 y las enzimas SRPK1 y CLK1 en células de la granulosa de bovino cultivadas a diferentes concentraciones de oxígeno, 5% CO ₂ , balance de nitrógeno a las 48 h.....	35
Figura 4. Expresión del ARNm de los receptores VEGFR1, VEGFR2, sVEGFR1 y sVEGFR2 en células de la granulosa de bovino cultivadas a diferentes concentraciones de oxígeno, 5% CO ₂ , balance de nitrógeno a las 48 h.....	36

ABREVIATURAS

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATP: Adenosín trifosfato

Akt: serina treonina kinasas

BAD: Agonista asociada BCL2 de la muerte celular

Bcl-2: Familia de proteínas de células del linfoma 2

CDC42: Proteína 42 de control de la división celular

CLK1: Cinasa 1 similar a CDC2

DAG: Diacilglicerol

DMOG: Dimetiloxaloilglicina

DSS: Sitio de empalme del donante

E₂: Estradiol

ERK: Cinasas reguladas por señales extracelulares

ESE: Potenciadores de empalme exónico

ESS: Silenciadores de empalme exónico

FAK: Cinasa de adhesión focal

FSH: Hormona foliculoestimulante

GREL: Células de tipo epitelial de la cresta gonadal

HIF-1 α : Factor Inducible de Hipoxia 1 alfa

HIF-1 β : Factor Inducible de Hipoxia 1 beta

HMVEC: Células endoteliales microvasculares humanas

HRE: Elemento de respuesta a hormona

RRM: Dominio de unión al ARN

HUVEC: Célula endotelial de la vena umbilical humana

IGF-1: Factor de crecimiento insulínico tipo 1

IP3: Inositos trifosfato

ISS: Silenciadores de empalme intrónico

Kd: Constante de disociación

LH: Hormona Luteinizante

MAPK: Proteínas cinasas activadas por mitógenos

Nkc: Región no catalítica de la proteína adaptadora de tirosina quinasa

P38 MAPK: Proteínas activadas por mitógenos 38

P450arom: Aromatasa P450

P450scc: Enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol P450

PBS: Buffer Fosfato Salino

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PGC: Células germinales primordiales

PHD: Prolil hidroxilasa

PI3K: Fosfatidilinositol 3 cinasa

PIP2: Fosfatidilinositol bifosfato

PKC: Proteína cinasa C

PKB: Proteína cinasa B

PLC: Fosfolipasa C

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

SCF: Factor de las células madre

SR: Serina/arginina

SRSF1: Factor de empalme rico en serina/arginina 1

SRSF6: Factor de empalme rico en serina/arginina 6

sVEGFR1: Receptor soluble 1 de VEGF

sVEGFR2: Receptor soluble 2 de VEGF

TGF: Factor de Crecimiento Transformante

Tr-SR: Transportina serina arginina

VEGF: Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular

VEGFR1: Receptor 1 de VEGF

VEGFR2: Receptor 2 de VEGF

VEGFxxx: Isoformas angiogénicas de VEGF

VEGFxxx_b: Isoformas antiangiogénicas de VEGF

VRAP: Molécula adaptadora específica de células T

ZP1: Glicoproteína de zona pelúcida 1

ZP2: Glicoproteína de zona pelúcida 2

ZP3: Glicoproteína de zona pelúcida 3

RESUMEN

Las células de la granulosa se han tenido que adaptar para llevar a cabo sus funciones metabólicas en condiciones de menor concentración de oxígeno, para esto produce moléculas indispensables para su metabolismo. Los componentes angiogénicos del sistema VEGF, juegan un papel importante en la migración, proliferación y supervivencia de las células de la granulosa. El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos del nivel de oxígeno sobre la expresión del ARNm de VEGFxxx, VEGFxxx_b y sus receptores en células de la granulosa de bovino en cultivo. Las células de la granulosa de folículos sanos de bovino fueron cultivadas con medio MacCoys 5a modificado (37°C, 5% de CO₂ y 95 % de humedad). Se mantuvieron por 48 h en jarras de anaerobiosis bajo las siguientes, condiciones: tratamiento 1: 2% oxígeno, 5% CO₂, balance de nitrógeno, tratamiento 2: 5% oxígeno, 5% CO₂, balance de nitrógeno. Grupo control: 18-20% de oxígeno, 5% CO₂. La expresión de cada gen se cuantificó por PCR tiempo real (qPCR) usando primers y sondas TaqMan diseñadas específicamente para cada uno de los genes. La expresión del ARNm de VEGF120, VEGF120_b y VEGF164 fue mayor ($P < 0.05$) en células cultivadas con 2% de oxígeno en comparación con 20% de oxígeno. Respecto a la isoforma VEGF164_b no se observaron concentraciones detectables de ARNm, en ninguno de los niveles de oxígeno evaluados en el presente experimento. Los receptores de membrana, no se observó diferencia ($P > 0.05$) en el número de copias por efecto del nivel de oxígeno en los cultivos de células de la granulosa. Sin embargo, la expresión del ARNm de los receptores solubles sVEGFR1 y sVEGFR2 mostraron un incremento lineal ($P < 0.05$) en el número de copias con el aumento en el nivel de oxígeno (20%). Podemos concluir que un ambiente con 2% de oxígeno favorece la mayor expresión del ARNm de VEGF120, VEGF120_b y VEGF164 en las células de la granulosa de bovino en cultivo y la expresión más baja de ARNm de sVEGFR1 y sVEGFR2, con lo cual seguramente se propiciar un medio autócrino que favorece los efectos proliferativos y de supervivencia de las células de la granulosa. Es probable que la condición de hipoxia fisiológica que viven las células de la

granulosa *in vivo*, produzca un ambiente similar a lo que observamos en este experimento y con ello se favorezca el desarrollo folicular.

ABSTRACT

Granulosa cells have had to adapt to carry out their metabolic functions under conditions of lower oxygen concentration, for this produces molecules essential for their metabolism. The angiogenic components of the VEGF system play an important role in the migration, proliferation and cell survival of granulosa. The objective of this work was to evaluate the effects of oxygen level on the expression of VEGFxxx mRNA, VEGFxxx_b and its receptors in bovine granulosa cells in culture. The granulosa cells of healthy bovine follicles were cultured with modified MacCoys 5a medium (37°C, 5% CO₂ and 95% humidity). They were maintained for 48 hours in anaerobic jugs under the following conditions: treatment 1: 2% oxygen, 5% CO₂, nitrogen balance, treatment 2: 5% oxygen, 5% CO₂, nitrogen balance. Control group: 18-20% oxygen, 5% CO₂. The expression of each gene was quantified by real time PCR (qPCR) using TaqMan primers and probes designed specifically for each of the genes. VEGF120, VEGF120_b and VEGF164 mRNA expression was higher (P <0.05) in cells cultured with 2% oxygen compared to 20% oxygen. Regarding the VEGF164_b isoform, no detectable mRNA concentrations were observed, at any of the oxygen levels evaluated in the present experiment. Membrane receptors, no difference (P > 0.05) was observed in the number of copies due to the effect of the level of oxygen in the granulosa cell cultures. However, mRNA expression of the sVEGFR1 and sVEGFR2 soluble receptors showed a linear increase (P <0.05) in the number of copies with the increase in oxygen level (20%). We can conclude that an environment with 2% oxygen favors the greater expression of VEGF120, VEGF120_b and VEGF164 mRNA in the cells of bovine granulosa in culture and the lowest expression of mRNA of sVEGFR1 and sVEGFR2, which will surely lead to an autocratic medium that favors the proliferative and survival effects of granulosa cells. It is likely that the condition of physiological hypoxia that the granulosa cells live *in vivo*, produces an environment similar to what we observed in this experiment and thereby follicular development is favored.

I. INTRODUCCIÓN

Los folículos son la unidad fundamental del ovario y éstos almacenan la célula germinal femenina (Chang *et al.*, 2016). En los folículos, durante sus primeras etapas de desarrollo, la célula germinal se encuentra rodeada por una capa de células somáticas que experimentan procesos de diferenciación que dan lugar a las células de la granulosa y de la teca (Hummitzsch *et al.*, 2019). Ambos tipos de células por proliferación forman varias capas de células de la granulosa, una capa de células de la teca externa y una de la teca interna. Mientras tanto el ovocito debe crecer y alcanzar la maduración (Rodgers y Irving-Rodgers, 2010; Rosales-Torres *et al.*, 2012).

En los primeros estadios del desarrollo folicular, el aporte de nutrientes, hormonas, factores de crecimiento y todo aquello que demanda el folículo para crecer y proveer al ovocito del ambiente adecuado para su maduración, es aportado por los vasos sanguíneos en el estroma ovárico (McFee *et al.*, 2012; Hummitzsch *et al.*, 2013). Durante la transición de folículo primario a secundario los folículos adquieren una red vascular propia, infiltrada entre las células de la teca. Esta red favorece posteriormente la formación de folículos antrales (Espinoza-Villavicencio *et al.*, 2007). Los vasos sanguíneos de la teca no penetran la capa basal que separa a estas células de las granulosa, de esta manera, las células de la granulosa permanecen avasculares hasta la ruptura de la capa basal, durante la ovulación (Bianco *et al.*, 2005; Rosales-Torres y Guzmán, 2012). Por lo tanto en el desarrollo folicular, las células de la granulosa, reciben los nutrientes, precursores hormonales y oxígeno por difusión simple desde las tecas (Thompson *et al.*, 2015). Debido a esto, las células de la granulosa se han adaptado para poder llevar a cabo sus procesos metabólicos como proliferación (Shiratsuki *et al.*, 2016), sobrevivencia (Gook *et al.*, 2014) y esteroidogénesis (Zeebaree *et al.*, 2018) en un ambiente de “hipoxia fisiológica”.

La función de las células de la granulosa es regulada por una gran cantidad de señales tróficas como gonadotropinas y factores de crecimiento entre las que se encuentra el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF; Laitinen *et al.*, 1997; Webb *et al.*, 2003). El VEGF se identificó como un factor que controla la

proliferación, supervivencia y permeabilidad de células endoteliales (Byrne *et al.*, 2005). Además se sabe que el VEGF induce la proliferación y supervivencia de otros tipos celulares como las células de la granulosa (Irusta *et al.*, 2010; Greenaway *et al.*, 2004).

A la fecha, se han descrito múltiples isoformas de VEGF que se originan por el corte y empalme alternativo en los exones 6 y 7 del gen de VEGF (Harvey y Cheng, 2016). Las isoformas VEGF120 y VEGF164 son las que se expresan mayormente en ovario de humanos y rumiantes (Ferrara *et al.*, 2003; Shimizu *et al.*, 2007). De cada isoforma, existen dos variantes, generadas por la selección del corte y empalme del sitio proximal 8a o distal 8b del exón 8. Si el empalme ocurre en el sitio proximal (8a) se producirán isoformas xxx (donde xxx representa el número de aminoácidos) y si el empalme ocurre en el sitio distal (8b) se producen isoformas xxxb (Nowak *et al.*, 2008). Los mecanismos moleculares que originan las isoformas xxxa o xxxb, no son muy claros, sin embargo, en tejido canceroso se han estudiado factores de empalme ricos en serina/arginina (SR) que desempeñan funciones importantes en la selección de exones 8a o 8b (Araki *et al.*, 2015). Además existen varias cinasas que fosforilan a las proteínas SR (Lai *et al.*, 2003). En concreto, cuando SRSF1 es fosforilado por la cinasa específica SRPK1 se promueve el corte y empalme de isoformas xxx, (Gammons *et al.*, 2013; Guyot *et al.*, 2016; Hatcher *et al.*, 2018). Por otro lado si la cinasa de proteína dual de la especificidad (CLK1) fosforila a SRSF6, el corte y empalme producirá isoformas xxxb (Biselli-Chicote *et al.*, 2012). Las isoformas xxx, al unirse a su receptor, tienen una transducción de señal más eficiente, permitiendo la supervivencia (Kosaka *et al.*, 2007), proliferación (Grasselli *et al.*, 2002) y migración (Rolaki *et al.*, 2007) celular. Sin embargo, las isoformas xxxb producen una fosforilación inadecuada del receptor y por lo tanto una transducción de señal disminuida (Nowak *et al.*, 2008).

La actividad de VEGF es mediada por los receptores de membrana de tipo tirosina cinasa VEGFR1 y VEGFR2 principalmente. Estos receptores tienen un dominio de unión al ligando, un dominio transmembranal y un dominio intracelular (Holmes *et al.*, 2007). La unión del ligando a su receptor permite la dimerización de receptores y a

su vez la fosforilación de los dominios tirosina cinasa (Koch *et al.*, 2011). El receptor VEGFR1 tiene una mayor afinidad al ligando pero una menor capacidad fosforilativa, lo que puede disminuir la actividad biológica de VEGF (Ulyatt *et al.*, 2011). Por el contrario el receptor VEGFR2 tiene una menor afinidad al ligando pero una mayor actividad fosforilativa (Ferrara *et al.*, 2004). Los efectos de proliferación, supervivencia, permeabilidad vascular y la migración celular de VEGF dependen del receptor VEGFR2, mientras que la unión del ligando a VEGFR1 estimula solamente la permeabilidad vascular y la migración celular (Irusta *et al.*, 2010; Roskoski, 2008). Adicionalmente, por procesamiento alternativo de la parte 3' del ARNm de los receptores de membrana se sintetizan dos receptores solubles (uno para cada gen) sVEGFR1 y sVEGFR2, que únicamente tienen el sitio de unión al ligando y carecen del dominio transmembranal e intracelular (Ortega-Serrano *et al.*, 2016). Por lo tanto, el VEGF puede unirse a los receptores solubles sVEGFR1 y sVEGFR2 sin provocar ningún efecto biológico en la célula, lo que los convierte en reguladores negativos de la función de VEGF (Waltenberger *et al.*, 1994).

La expresión de VEGF y sus receptores es regulada por una gran cantidad de señales, sin embargo, es bien sabido que la hipoxia es el regulador más importante de la síntesis de VEGF. (Stewart *et al.*, 2002). En condiciones de hipoxia, el Factor Inducible de Hipoxia (HIF-1 α) escapa de la degradación y es translocado al núcleo para unirse a las regiones promotoras del gen de VEGF e iniciar su transcripción (Pan *et al.*, 2015).

Basados en esta información el objetivo de la presente tesis fue evaluar los efectos del nivel de oxígeno sobre la expresión del ARNm de xxx y xxxb y sus receptores, en cultivo de células de la granulosa de bovino, así como de los factores de corte y empalme y sus enzimas fosforilativas SRSF1/SRPK1, SRSRF6/CLK1.

II. ANTECEDENTES

2.1 Anatomía y Fisiología del Folículo ovárico

2.1.1 Origen embrionario de los ovarios

El desarrollo de los ovarios durante la etapa fetal comienza en el epitelio de la superficie mesonéfrica donde algunas células epiteliales cambian su fenotipo a “células de tipo epitelial de la cresta gonadal” (GREL; Hummitzsch *et al.*, 2013). La proliferación de las células GREL forma la cresta gonadal, y la lámina basal del epitelio de la superficie mesonéfrica se rompe permitiendo la entrada de células estromales (Hummitzsch *et al.*, 2013; Hummitzsch *et al.*, 2019). Por otro lado, las células germinales primordiales (PGC) que se originan en el endodermo de la pared del saco vitelino migran, bajo el control del factor de las células madre (SCF), a través del intestino primitivo hacia el mesenterio dorsal y continúan su recorrido hasta llegar a la cresta gonadal e invadirla (Mamsen *et al.*, 2012). Las PGC continúan su migración dentro de la cresta gonadal entre las células GREL en proliferación, mientras el estroma y sus vasos sanguíneos penetran la superficie ovárica (Hummitzsch *et al.*, 2013). El estroma y la lámina basal rodean a las células germinales mitóticamente activas y a las células GREL, para formar los cordones ovígeros. Estos cordones se subdividen hasta que se constituyen los primeros folículos primordiales (Hummitzsch *et al.*, 2013).

2.1.2 Estructura del ovario

Los ovarios son una unidad anatómica y funcional para la reproducción de la hembra y sus funciones principales son la producción de gametos (ovogénesis) y la síntesis de esteroides (Motta *et al.*, 2011). Partiendo de la parte superficial, los ovarios tienen un epitelio germinal, la túnica albugínea la corteza y la medula. La región medular, ubicada en la región central del ovario está formada por tejido conjuntivo laxo y una red de vasos sanguíneos linfáticos y nervios y la corteza o región cortical que se

encuentra en la región periférica está constituida por folículos en diferentes estadios de desarrollo incluidos en tejido conjuntivo (Ross y Pawlina, 2016; Araki, 2003). Cada folículo contiene un ovocito rodeado por células somáticas las cuales durante desarrollo folicular, tiene procesos de diferenciación, proliferación y sobrevivencia, y a la par se lleva a cabo la maduración del ovocito (Zhang y Liu, 2015). Los tipos de folículos localizados en la corteza del ovario se clasifican como folículos pre-antrales que incluye a los folículos primordiales, primarios, secundarios y folículos antrales que incluye a los folículos terciarios de diferentes diámetros y a los folículos preovulatorios (Kranc *et al.*, 2016).

2.1.3 Desarrollo Folicular

2.1.3.1 Reclutamiento

El reclutamiento cíclico inicia cuando una cohorte de 5 hasta 24 folículos antrales, con un diámetro de 4 a 5 mm, inician su crecimiento por un aumento transitorio de Hormona Folículo Estimulante (FSH; Aerts y Bols, 2010). En esta etapa, las células de la granulosa tienen receptores para FSH y las células de la teca receptores a Hormona Luteinizante (LH; Friberg *et al.*, 2008). Estas dos hormonas se unen a sus receptores y estimulan la proliferación y sobrevivencia de células foliculares y la síntesis de estradiol, y promueven el crecimiento de los folículos (Vázquez-Cano, 2010). En bovinos, de la cohorte de folículos que inician la oleada, solo uno continuará su crecimiento, mientras que los demás folículos presentaran un proceso de degeneración llamado atresia (Ferrara *et al.*, 2003; Mihm y Evans, 2008).

2.1.3.2 Selección y dominancia

La selección del folículo dominante ocurre cuando un folículo reclutado alcanza un diámetro de 8.5 mm (Mihm y Evans, 2008). El folículo seleccionado como dominante

adquiere receptores para LH en células de la granulosa y aumenta la capacidad de síntesis de estradiol (E_2) e inhibina. La síntesis de estas dos hormonas provoca una retroalimentación negativa a nivel de la adenohipófisis, lo que ocasiona que los niveles de FSH comiencen a disminuir (Espinoza-Villavicencio *et al.*, 2007). Esto genera que los folículos subordinados dejen de crecer y se tornen atrésicos, mientras que el folículo dominante, al tener más receptores a FSH y LH y a que cambia su dependencia a LH, puede continuar su crecimiento aun con concentraciones bajas de FSH (Clark *et al.*, 2004).

2.3 Células de la Granulosa

Un folículo preovulatorio o de Graff se compone de un ovocito que es rodeado por la zona pelúcida (glucoproteínas ZP-1, ZP-2 y ZP-3), tejido epitelial estratificado que corresponde a 2-3 capas internas de células de la granulosa, llamadas células del *cumulus* y 5-10 capas externas de células, llamadas células de la granulosa murales que rodean al antro folicular (Jaffe y Egbert, 2017). Las células del *cúmulo oóforo* que rodean en forma inmediata el ovocito y permanecen con él en la ovulación, forman la corona radiada (Kranc *et al.*, 2016). En el estroma del tejido conectivo que rodea al epitelio, las células de la teca forman una vaina de células (3-5 capas), las cuales se diferencian en dos: teca interna capa interna (muy vascularizada) y teca externa (capa más externa que contiene células de músculo liso, o algunos las consideran como mioepiteliales; Magoffin, 2005). Las células de la teca se separan de la granulosa por una lámina basal, que permite el paso selectivo de moléculas de un lado de la lámina a otro, retardando la entrada de moléculas del plasma de mayor peso molecular (lipoproteínas; Rodgers *et al.*, 2000). Una de las características importantes de las células de la granulosa es que son avasculares, esto es debido a que al agruparse, conforman un tejido de tipo epitelial. Éste posee la característica de carecer de vasos sanguíneos, mientras que las células de teca se encuentran conformando otro tipo de tejido como lo es el conectivo que tiene como característica la presencia de vasos sanguíneos (Ross y Pawlina, 2016). El líquido folicular está

formado por la extravasación de los vasos sanguíneos que irrigan el tejido conectivo donde se encuentran las células de la teca además de moléculas que sintetizan las células foliculares (Salustri *et al.*, 2019).

La función principal de las células de la granulosa es proporcionar el soporte físico y los nutrientes, las moléculas y el microambiente necesario para el desarrollo del ovocito (Irving-Rodgers y Rodgers, 2005). Para lograr este objetivo es importante la comunicación bidireccional entre los ovocitos y las células de la granulosa. Para esto, las células de la granulosa están en contacto con el ovocito y entre las mismas células de granulosa, por uniones intercelulares (Gap; Su *et al.*, 2009). Las uniones Gap permiten el paso directo de moléculas que sintetizan las células de la granulosa como metabolitos, aminoácidos, moléculas de señalización intracelular, hormonas y factores de crecimiento entre las propias células y desde y hacia el ovocito (Su *et al.*, 2009).

Dentro de las principales moléculas que sintetizan las células de la granulosa se encuentran las hormonas esteroideas: estradiol y progesterona (Hu *et al.*, 2010). La síntesis de estradiol requiere de la colaboración de las células de la teca, debido a que las células de la teca producen androstenediona en respuesta a la LH (Patel *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2010). Los andrógenos se difunden a las células de la granulosa a través de la membrana basal del folículo y son transformados en estradiol por la presencia del complejo enzimático P450arom en respuesta a FSH (Magoffin, 2005). La progesterona se sintetiza en las células de la granulosa a partir del colesterol por la acción de las enzimas P450scc y 3 β HDS (Hu *et al.*, 2010). Las células de la granulosa también sintetizan inhibina la cual ejerce una retroalimentación negativa sobre la FSH (Li *et al.*, 2018). En las células de la granulosa también se sintetizan factores de crecimiento como es el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1; Schams *et al.*, 2002) que tiene efectos proliferativos sobre las mismas células, y el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) que induce la proliferación y supervivencia de las células de la granulosa (Irusta *et al.*, 2010; Greenaway *et al.*, 2004).

2.4 Irrigación sanguínea de los folículos

Los vasos sanguíneos de la médula forman un plexo, que da lugar a redes que se dirigen a la corteza ovárica. Las arterias que se conducen a la periferia se subdividen y se ubican alrededor de los folículos (Russo *et al.*, 2017).

Los folículos primordiales y primarios no tienen una red vascular propia por lo que reciben oxígeno, nutrientes, hormonas y factores de crecimiento a través de los vasos sanguíneos localizados en la corteza ovárica (Hummitzsch *et al.*, 2013; Bruno *et al.*, 2009). En los folículos secundarios se diferencian varias capas de células de la granulosa y las capas de células de la teca interna, en la cual comienza a formarse una red de vasos sanguíneos, sin embargo las células de la granulosa permanecen avasculares. La formación de estos vasos, permite la formación del antro folicular (Russo *et al.*, 2017).

Los folículos antrales presentan varias capas de células de granulosa y las capas de las células de la teca interna y externa se encuentran bien diferenciadas (Aerts y Bols, 2010). Los folículos antrales presentan dos redes de vasos sanguíneos concéntricas ubicadas en la teca interna y la teca externa. Los vasos de red interna son de diámetro relativamente pequeño y la red externa se caracteriza por vasos sanguíneos de mayor diámetro (Stouffer *et al.*, 2001; Russo *et al.*, 2017). Los vasos sanguíneos de la teca no penetran en la membrana basal localizada entre la teca interna y la granulosa, por lo que las células de la granulosa permanecen avasculares hasta la ruptura de la lámina basal en la ovulación (Bianco *et al.*, 2005; Rosales-Torres *et al.*, 2012).

2.5 Angiogénesis y regulación

La angiogénesis se define como el proceso mediante el cual se establecen nuevos vasos sanguíneos derivados de los vasos sanguíneos preexistentes (Ellis, 2001). La angiogénesis ocurre en diversos procesos fisiológicos como es el desarrollo embrionario, desarrollo folicular y cicatrización de heridas, así como procesos patológicos como es la formación de tumores (Vailhé *et al.*, 2001). La angiogénesis depende del equilibrio activo de factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos, producidos localmente o en otros tipos celulares (García *et al.*, 2005). En la primera etapa de la formación de los nuevos vasos sanguíneos la matriz extracelular y la membrana basal se degradan por las proteasas producidas por las células endoteliales (Vailhé *et al.*, 2001). Las células endoteliales migran hacia la zona donde se desarrollara el nuevo vaso sanguíneo y subsecuentemente, en la parte media del vaso sanguíneo, las células endoteliales proliferan y se ensamblan para formar la luz dentro del brote endotelial (Jussila y Alitalo, 2002). El nuevo vaso sufre anastomosis con el vaso adyacente para ser perfundido con circulación sanguínea. La siguiente fase es la de estabilización y consiste en la detención de la proliferación de células endoteliales, la reconstrucción de una membrana basal alrededor del nuevo capilar, cobertura del capilar inmaduro con pericitos y células de músculo liso, que dan lugar a la formación de un vaso maduro (Hellström *et al.*, 2001).

Existen distintas moléculas implicadas en la regulación de la angiogénesis. El VEGF es importante para la fase de crecimiento, el factor de crecimiento transformante (TGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), angiopoyetina 1 y sus respectivos receptores son esenciales para la fase de estabilización (Vailhé *et al.*, 2001; Saavedra *et al.*, 2017). Las principales funciones de VEGF son promover sobrevivencia e inducir la proliferación y la migración de las células endoteliales (Byrne *et al.*, 2005). En tres líneas de ratones transgénicos se determinó que VEGF165 es un potente mediador de la migración y la proliferación de células endoteliales alrededor del cristalino (Ash y Overbeek, 2000). En cultivo de células endoteliales de vena umbilical de humano, la adición de 3 y 10 ng/ml de VEGF al

medio de cultivo incrementó tanto la proliferación como la migración de dichas células (Fierro *et al.*, 2002).

2.6 Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)

La familia de las proteínas de VEGF está constituida por VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y factor de crecimiento placentario (PLGF), siendo el más estudiado el VEGF-A, el cual es comúnmente referido solo como VEGF (Koch *et al.*, 2011). El gen que codifica la proteína de VEGF está formado por 8 exones y 7 intrones. Durante la maduración del ARNm por corte y empalme generan hasta 12 isoformas diferentes en mamíferos (Nowak *et al.*, 2008). Durante el proceso de corte y empalme alternativo del ARNm de VEGF se conservan los 5 primeros exones, sin embargo en la inclusión o eliminación de los exones 6a, 6b, 7a, 7b, 8a y 8b genera 21 diferentes ARNm que dan lugar a proteínas con diferente número de aminoácidos (aa) y con funciones biológicas distintas (Harvey y Cheng, 2016). Estas proteínas son identificadas como VEGFxxx, donde xxx representa el número de aa de la proteína (Harvey y Cheng, 2016). Cabe mencionar que en mamíferos no humanos estas isoformas están formadas por un aa menos (Rosales-Torres y Guzmán, 2012). Existen otras variantes de VEGF descritas por Bates *et al.*, (2002) generadas por la selección en el sitio proximal (8a) o distal (8b) del exón 8. Cuando el corte y empalme ocurre en la región proximal 8a, (tgtgacaagccgaggcgggtga) se codifica una proteína con funciones angiogénicas; las principales isoformas de la familia VEGFxxx son VEGF165, VEGF189, VEGF121, VEGF145, VEGF183, VEGF206 y VEGF111 (Gu *et al.*, 2013). En contraste, cuando el corte y empalme se da en la región distal 8b (tctctcaccaggaaagactga) se codifica una proteína con funciones antiangiogénicas (Nowak *et al.*, 2008; Dehghanian *et al.*, 2014). Las isoformas VEGFxxx identificadas son VEGF121b, VEGF165b, VEGF145b y VEGF183b (Nowak *et al.*, 2008). En humanos y rumiantes las isoformas VEGF120 y VEGF164 son las que se expresan mayormente y son las que están asociadas con el desarrollo folicular (Ferrara *et al.*, 2003; Shimizu *et al.*, 2007). Las isoformas angiogénicas, al unirse a su receptor,

tienen una transducción de señal más eficiente permitiendo la supervivencia (Kosaka *et al.*, 2007), proliferación (Grasselli *et al.*, 2002) y migración (Rolaki *et al.*, 2007) de las células endoteliales. Las distintas isoformas VEGFxxx se unen al dominio extracelular provocando la dimerización de los receptores y la fosforilación intracelular del dominio de tirosina cinasa (Kou *et al.*, 2004), activando así a la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K), serina treonina cinasa (Akt) y la proteína cinasa B (PKB). La proteína Akt inhibe la apoptosis a través de su interacción con las caspasas 9 y de BAD, miembro de la familia BCL-2, promoviendo la supervivencia celular (Byrne *et al.*, 2005; Datta *et al.*, 1997). El diacilglicerol (DAG) está involucrado en la activación de la proteína cinasa C (PKC), en particular la forma PKC β , la cual se fosforila y activa la ruta Ras/MAPK (Proteínas cinasas activadas por mitógenos) y cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK). Las ERK activadas se traslocan al núcleo y activan factores de transcripción, cambiando la expresión génica para promover la mitosis y por lo tanto la proliferación celular (Byrne *et al.*, 2005). El VEGF induce la migración celular mediante la activación de moléculas como las cinasas de adhesión focal (FAK), proteínas activadas por mitógenos 38 (P38 MAPK) involucradas en la migración y permeabilidad vascular (Hayakawa *et al.*, 2011).

En contraste, las isoformas VEGFxxx_b se unen al receptor con la misma afinidad que las isoformas VEGFxxx pero ocasionan una autofosforilación ineficiente del receptor. Por esta razón la señalización es pobre, y de esta forma también lo es la respuesta celular (McFee *et al.*, 2012; Nowak *et al.*, 2008; Biselli-Chicote *et al.*, 2012). En cultivo de células endoteliales el tratamiento con VEGF165b inhibió la proliferación y migración mediada por VEGFA165 (Bates *et al.*, 2002). Además la inyección intraocular de VEGF165b en humanos demostró que VEGF165b inhibe la neovascularización de la retina (Konopatskaya *et al.*, 2006).

2.7 Factores de Corte y empalme y las enzimas que los fosforilan

La maduración de ARNm de la mayoría de los genes consiste en la adición de una caperuza en el extremo 5' la cual es un nucleótido de guanina modificado, la

poliadenilación el extremo 3' (adición de una cadena consecutiva de entre 50 y 200 adeninas llamada poliA) y corte y empalme del ARNm inmaduro. El corte y empalme consiste en la eliminación de las secuencias no codificantes del gen (intrones), y empalme de las secuencias codificables (exones; Alberts, 2008; Stamm *et al.*, 2005). El corte y empalme alternativo es un mecanismo por el cual se generan un gran número de isoformas y proteínas a partir de un solo precursor de ARNm con diferentes funciones. A diferencia del corte y empalme, en el empalme alternativo en algunos genes también se eliminan exones completos o parte de estos (Alberts, 2008). Durante el corte y empalme, un complejo macromolecular llamado spliceosoma reconoce los exones y elimina los intrones. El spliceosoma se compone por al menos 170 proteínas y cinco snRNAs (pequeños ARN nucleares) U1, U2, U4, U5 y U6 (Van Der Feltz *et al.*, 2012). Un exón se compone por tres elementos principales: sitio de empalme 5', sitio de empalme 3' y el punto de ramificación. El spliceosoma reconoce estos elementos y se ensambla de manera gradual en ARNm recién sintetizado (Kelemen *et al.*, 2013). Los exones necesitan factores adicionales para ser reconocidos, estos factores se unen a las secuencias exónicas o intrónicas. Por un lado, estos factores se unen a potenciadores exónico ESE (potenciadores de empalme exónico) y ayudan a facilitar el reclutamiento de los componentes del spliceosoma al ARNm. Por otro lado la unión del factor a silenciadores de empalme exónico (ESS) o silenciadores de empalme intrónico (ISS) bloquean la formación del complejo e inhiben el reconocimiento del exón (Jamros *et al.*, 2015; Schaal y Maniatis, 1999).

En la selección de los sitios de corte y empalme participan factores como son las proteínas ricas en serina-arginina (SR), caracterizadas por tener un dominio rico en argininas y serinas de interacción proteína-proteína en su región carboxilo terminal, precedido por al menos un dominio de unión al ARN (RRM) en el extremo amino terminal (Twyffels *et al.*, 2011). Mediante sus dominio RRM, las proteínas SR reconoce elementos reguladores presentes en el ARNm como son los ESE, y a través del motivo RS establecen puentes de unión con factores que forman parte del spliceosoma, reclutándolos y estabilizándolos para favorecer el reconocimiento del exón, por lo tanto regulan la selección del sitio de empalme (Busch y Hertel, 2012).

En humanos se han descrito una familia de 12 proteínas SR y la expresión de estas varía ampliamente entre tipos celulares (Twyffels *et al.*, 2011).

Como ya se mencionó anteriormente el corte y empalme alternativo de los exones 8a/8b del ARNm de VEGF da lugar a dos grupos de isoformas, unas con actividad angiogénica (VEGFxxx) e otras isoformas con actividad anti-angiogénica (VEGFxxx_b). La regulación del sitio de corte y empalme del exón 8 de VEGF es regulado por varias proteínas SR, en análisis de la secuencia del ARNm de VEGF se encontró un sitio de unión del factor de corte y empalme rico serina-arginina 1 (SRSF1) río arriba de la región DSS (sitio de empalme del donante), y un sitio de unión para factor de empalme rico en serina y arginina 6 (SRSF6) río abajo de la región DSS (Megan y Oltean, 2018). En cultivo de células transformadas del epitelio pigmentado de humano, que expresan constitutivamente las isoformas VEGFxxx y VEGFxxx_b se demostró que SRSF1 y SRSF5 promueven el corte y empalme proximal (8a) del exón 8 que da lugar a las isoformas VEGFxxx, por el contrario, SRSF6 y SRSF2 facilitar la selección del sitio proximal (8b; Nowak *et al.*, 2008) que da lugar a las isoformas VEGFxxx_b. A nivel folicular, recientemente se demostró que en células de la granulosa de folículos sanos y atrésicos de bovinos se expresa a nivel de ARNm tanto la SRSF1 como la SRSF6 (Zamora-Gutiérrez *et al.*, 2019).

La fosforilación de las proteínas SR promueve la unión al ARN mediante la reducción del dominio SR. Por otra parte, las interacciones entre las proteínas SR y otros componentes del spliceosoma pueden ser afectados por el dominio RS fosforilado / desfosforilado (Lai *et al.*, 2003). Las proteínas SR se localizan predominantemente en el núcleo y se distribuyen en el citoplasma en estado hiperfosforilado y para su importación desde el citoplasma necesitan ser fosforiladas para facilitar la unión de SR a la transportina (Tr-SR) y por lo tanto la entrada de la proteína al núcleo (Aubol *et al.*, 2013; Lai *et al.*, 2003). Existen varios tipos de cinasas que fosforilan a las proteínas SR, como las cinasas CLK1, las cuales se localizan predominantemente en núcleo, y las SRPK1 que se localizan tanto en el núcleo como en el citoplasma (Lai *et al.*, 2003). Estas dos cinasas presentan especificidad al sustrato, estudios detallados indican que la enzima SRPK1 se dirige principalmente a repeticiones Arg-

Ser más largas en el dominio RS del factor SRSF1 (Jamros *et al.*, 2015). De esa manera la proteína SRPK1 fosforila la SRSF1 para promover la síntesis de isoformas VEGFxxx (Nowak *et al.*, 2010), mientras que CLK1 puede activar el SRSF6 para inducir la síntesis de VEGFxxx_b (Nowak *et al.*, 2008). El SRSF1 fosforilado es indicativo de un fenotipo angiogénico ya que da como resultado el empalme proximal y la producción de isoformas angiogénicas de VEGF (Wu *et al.*, 2013). En líneas celulares de glioma la eliminación de SRPK1 inhibió el crecimiento, la invasión y la migración de las células tumorales en condiciones normóxicas, sin embargo, en condiciones de hipoxia este efecto fue parcialmente revertido (Wu *et al.*, 2013). En el modelo de retinopatía inducida por oxígeno, la inactivación de SRPK1 reduce la expresión de ARNm de la isoforma VEGF165 sin afectar la expresión ARNm de VEGFR165_b (Gammons *et al.*, 2013). En las células de epitelio pigmentado de la retina transfectadas con SRSF6, hay un aumento en la síntesis de VEGF165_b, mientras que la inhibición de la SRSF6 o CLK1 reduce la síntesis de VEGF165_b (Nowak *et al.*, 2008).

2.8 Mecanismos de Acción de VEGF

Los efectos biológicos de VEGF son mediados principalmente por dos receptores de membrana tipo tirosina-cinasa. Estos receptores son el VEGFR1 (Flt-1) y el VEGFR2 (Flk-1/KDR) y están formados por un dominio extracelular que comprende siete dominios similares a inmunoglobulina (I-VII), de los cuales el segundo y tercer dominio unen VEGF-A (Holmes *et al.*, 2007), una región transmembranal y un dominio intracelular que contiene dos dominios de cinasa, que se dividen por un dominio cinasa de 70 aminoácidos y cinco residuos de tirosina que se han identificado como los principales sitios de fosforilación (Y951, Y1054, Y1059, Y1175 y Y1214; Roskoski, 2008; Bruns *et al.*, 2010; Holmes *et al.*, 2007). El receptor VEGFR1 se expresa en células madre hematopoyéticas, monocitos, macrófagos y células endoteliales vasculares ováricas, mientras que VEGFR2 se expresa en células endoteliales vasculares y células endoteliales linfáticas y también en células

ováricas (Koch *et al.*, 2011; Holmes *et al.*, 2007). Existen evidencias de que los genes de VEGFR1 y VEGFR2 se expresan en células de la granulosa y teca de folículos en distintas especies y se han asociado con la activación de la función de las células de la granulosa y el proceso de crecimiento del folículo en el ovario (Shimizu *et al.*, 2002; Shimizu *et al.*, 2006).

La unión del ligando de VEGF al receptor se ha descrito detalladamente en células endoteliales, antes de la unión del ligando a los receptores se encuentran en estado de monómeros y sin ninguna actividad enzimática (Koch *et al.*, 2011). La unión de VEGF a alguno de sus receptores de membrana promueve la homo o heterodimerización y se estabiliza mediante puntos de contacto entre los dominios extracelulares similares a inmunoglobulina (I-XII; Koch *et al.*, 2011). La dimerización se acompaña de cambios en la conformación del dominio intracelular, estos cambios conformacionales conducen a la exposición del sitio de unión de adenosin trifosfato (ATP) en el dominio de la cinasa intracelular, seguido de la unión de ATP y la fosforilación de los residuos de tirosina en el propio dímero (autofosforilación), así como en los transductores de señal (Koch *et al.*, 2011; Roskoski, 2008). Existen dos mecanismos posibles para la autofosforilación: el mecanismo *cis*, donde el receptor monomérico cataliza su propia fosforilación y mecanismo *trans*, donde un receptor de un dímero sirve como enzima, mientras que el otro sirve como sustrato y viceversa (Roskoski, 2008). Después de esto, se recluta una variedad de moléculas de señalización que dan lugar al ensamblaje de grandes complejos moleculares, las llamadas partículas de transducción de señales o señalosomas que activan distintas vías celulares (Stuttfeld y Ballmer-Hofer, 2009). Dentro de estas vías tenemos, la activación de la fosfolipasa C (PLC- γ) que provoca la hidrólisis de fosfoinositol 2 fosfato (PIP₂), generando los segundos mensajeros DAG e inositol trifosfato (IP₃). El DAG es un activador fisiológico de PKC, la cual a través de la vía Rac/MEK favorece la proliferación celular, mientras que IP₃ actúa sobre los receptores en el retículo endoplásmico causando la liberación de calcio intracelular (Holmes *et al.*, 2007). La entrada de calcio extracelular es importante para la activación de proteínas. La activación de la molécula adaptadora específica de células T (VRAP) forma un complejo con las proteínas cinasas Src y Shb para regular la activación de cinasas

de adhesión focal (FAK) y PI3K, activando la permeabilidad y la migración celular (Koch *et al.*, 2011). La fosforilación de proteínas adaptadoras (Nck) da como resultado la activación del homólogo de la proteína 42 de control de división celular (Cdc42) y p38 MAPK involucradas en la migración y permeabilidad vascular. La activación de PI3K genera PIP3 para así activar la vía PKB/Akt y favorecer la sobrevivencia celular (Holmes *et al.*, 2007).

El receptor VEGFR1 tiene una mayor afinidad por el ligando de VEGF con una constante de disociación (Kd) de 16 picomolar (pM), pero una menor capacidad fosforilativa (Joukov *et al.*, 1996; Ulyatt *et al.*, 2011). Por esta razón el VEGF, a través de VEGFR1, solamente activa las vías de señalización que permiten la migración celular y la permeabilidad vascular (Takahashi y Shibuya, 2005). Por el contrario, VEGFR2 tiene una menor afinidad por el ligando de VEGF con una constante de disociación (Kd) 760 picomolar (pM), pero una mayor actividad fosforilativa, de manera que este receptor es el principal mediador de los efectos biológicos de VEGF (Joukov *et al.*, 1996; Ferrara *et al.*, 2004). El VEGF a través de VEGFR2 activa las vías de señalización que permiten la proliferación, la supervivencia, la permeabilidad vascular y la migración celular (Holmes *et al.*, 2007; Ortega-Serrano *et al.*, 2016).

Adicionalmente, de cada uno de los receptores de membrana se producen isoformas solubles por corte y empalme del ARNm inmaduro. Mientras el ARNm de VEGFR1 de longitud completa consta de 30 exones la forma soluble sVEGFR1 solo contiene los primeros 13-14 exones. (Abou-Fayçal *et al.*, 2017). Se ha descrito que la forma soluble sVEGFR2 es generada por la retención del intrón 13 (Stevens y Oltean, 2019) y subsecuente corte y poliadenilación en secuencias pertenecientes a este intrón. Las isoformas solubles carecen del séptimo dominio similar a la inmunoglobulina, así como de las regiones transmembrana y los dominios de tirosina cinasa intracelular (Saito *et al.*, 2013). Debido a las características estructurales descritas, los receptores solubles tienen efectos inhibitorios sobre la actividad de VEGF, ya que la unión del ligando al receptor no provoca la activación de cascadas de señalización intracelular y por lo tanto VEGF no tiene actividad biológica en la células (Abou-Fayçal *et al.*, 2017). Los receptores solubles atrapan al ligando y

reducen la biodisponibilidad de VEGF para la activación del receptor de membrana (Saito *et al.*, 2013).

El receptor soluble sVEGFR1 se expresa principalmente en células endoteliales vasculares, monocitos mononucleares de sangre periférica activados, trofoblastos placentarios, células epiteliales y células tubulares proximales del epitelios renales y células ováricas (Wu *et al.*, 2009). Existe la evidencia de la presencia de ARNm de sVEGFR1 en cuerpo lúteo en cerdas (Kaczmarek *et al.*, 2005). En estudios *in vivo* se determinó la expresión de ARNm sVEGFR2 y sVEGFR1 de folículos sanos y atrésicos (Hummitzsch *et al.*, 2012; Ortega-Serrano *et al.*, 2016; Zamora-Gutiérrez *et al.*, 2019). Esta amplia variedad de tipos de células capaces de expresar sVEGFR1 y sVEGFR2 sugeriría su participación activa en múltiples condiciones fisiológicas y patológicas (Wu *et al.*, 2009).

2.9 VEGF y función ovárica

En los últimos años se ha evidenciado la participación de VEGF no solo en la formación de vasos sanguíneos requeridos para el desarrollo e integridad de los folículos, sino en la citoprotección (Greenaway *et al.*, 2004) y proliferación (Irusta *et al.*, 2010) de las células de la granulosa. Estudios en ratones muestran que la inyección de fragmentos activos del gen de VEGF directamente en el ovario aumentó el número de folículos preovulatorios y redujo el porcentaje de folículos con atresia (Shimizu *et al.*, 2007). Además la inyección de un antagonista de VEGF en ovarios de mono titi inhibió significativamente la proliferación de células endoteliales e indujo la pérdida en la vascularización del folículo (Taylor *et al.*, 2007). Las células de la granulosa de folículos post-seleccionados, presentan una mayor expresión del ARNm de VEGF120, VEGF164 que las células de los folículos preseleccionados (Shimizu *et al.*, 2007). En diversos tejidos, como el útero (Walter *et al.*, 2010), cuerpo lúteo (Guzmán *et al.*, 2015) y células de la granulosa, se ha demostrado que las isoformas VEGF-120 y VEGF164, son las más abundantes y están relacionadas con la angiogénesis durante el desarrollo folicular (Shimizu *et al.*, 2007).

2.10 Regulación de la expresión de VEGF

La regulación en la expresión de las isoformas VEGF está mediada por diferentes factores, dentro de los cuales la hipoxia es el más importante (Zhang *et al.*, 2011). En tejidos bajo condiciones de hipoxia, hay una estabilización del Factor Inducible de Hipoxia 1 α (HIF-1 α), el cual estimula la transcripción de ARNm de VEGF (Zhang *et al.*, 2011). En cultivo de células endometriales de humano, cultivadas bajo condiciones de hipoxia existe un aumento en la producción de la proteína de HIF-1 α , y del ARNm de VEGF (Tsuzuki *et al.*, 2012). Así mismo, en células lúteas cultivadas en condiciones de hipoxia química con COCl₂ (Clorhidrato de Cobalto), se observó un aumento en la expresión del ARNm de VEGF y de la proteína de HIF-1 α (Zhang *et al.*, 2011).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las células de la granulosa, y el propio ovocito se desarrollan en un ambiente de “hipoxia fisiológica”, las células de la granulosa reciben señales tróficas desde la circulación periférica, a través de difusión simple o bien producen moléculas indispensables para su metabolismo. El sistema VEGF es un importante regulador del desarrollo folicular, se produce en células de la teca y granulosa, y es el principal sistema encargado de estimular la angiogénesis en las células de la teca así como la proliferación y sobrevivencia de las células de la granulosa. Los integrantes angiogénicos del sistema VEGF lo componen las isoformas VEGFxxx y VEGFR2, mientras que los integrantes antiangiogénicos son: VEGFxxx_b, VEGFR1, sVEGFR1 y sVEGFR2. Los efectos antiangiogénicos de las isoformas VEGFxxx_b, se deben a su menor capacidad para fosforilar a los receptores, y en el caso de los tres receptores, se debe a su acción competitiva por el ligando y su incapacidad para la señalización intracelular en el caso de los receptores solubles, lo que los convierte en reguladores negativos de la función de VEGF. Poco se conoce sobre los mecanismos que regulan la expresión de los integrantes angiogénicos y antiangiogénicos del sistema VEGF. En tejidos cancerosos existen evidencias de que el complejo SRSF1/SRPK1 determina la expresión de las isoformas VEGFxxx mientras que el complejo SRSF6/CLK1 favorece la expresión de VEGFxxx_b. Considerando que el desarrollo de un folículo se da en un ambiente hipóxico similar a lo que ocurre en el crecimiento de un tumor y que uno de los principales mecanismos que regula la expresión de los componentes del sistema de VEGF es la hipoxia, nos proponemos analizar los efectos de tres niveles de oxígeno en la regulación de la expresión del ARNm de los componentes angiogénicos (VEGF120, VEGF164 y VEGFR-2) y antiangiogénicos (VEGF120_b, VEGF164_b, VEGFR-1, sVEGFR-1 y sVEGFR-2) del sistema VEGF, y comprobar si la presencia VEGFxxx y VEGFxxx_b están relacionadas con la expresión del ARNm de los complejos SRPK1/SRSF1 y CLK1/SRSF6 respectivamente.

3.1 Pregunta de Investigación

¿Cuáles serán los patrones de expresión de los componentes del sistema VEGF (ligandos y receptores) cuando se modifican los niveles de oxígeno en cultivos de células de la granulosa de bovino?

¿Las enzimas y los factores de corte y empalme SRSF1/SRPK1 y SRSF6/CLK1, se correlacionarán positivamente con las isoformas angiogénicas y antiangiogénicas respectivamente?

¿Cómo se modificarán los patrones de expresión de SRSF1/SRPK y SRSF6/CLK1 por efecto del nivel de oxígeno en cultivos de células de la granulosa de bovino?

IV. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de tres concentraciones de O₂ en el patrón de expresión de los componentes del sistema VEGF en células de la granulosa de bovino, así como de los factores de corte y empalme y sus enzimas forforilativas SRSF1/SRPK1 y SRSRF6/CLK1.

4.1 Objetivos Particulares

- Identificar el nivel de oxígeno en el cual se presenta una mayor expresión de las isoformas angiogénicas de VEGF en células de la granulosa de folículos ováricos de bovino y evaluar si esto está relacionado con la mayor expresión del ARNm de SRSF1 y de la enzima forforilante SRPK1.
- Identificar el nivel de oxígeno en el cual se presenta una mayor expresión de las isoformas antiangiogénicas de VEGF en células de la granulosa de folículos ováricos de bovino y evaluar si esto está relacionado con la expresión del ARNm de SRSF6 y de la enzima fosforilante CLK1.
- Evaluar el efecto del nivel de oxígeno sobre la expresión de los receptores VEGFR1, VEGFR2 y sus formas solubles en células de la granulosa de folículos ováricos de bovino

V. HIPÓTESIS

- La expresión de los componentes del sistema VEGF (VEGF120, VEGF120b, VEGF164, VEGFR1, VEGFR2, sVEGFR1, sVEGFR2) en células de la granulosa de bovino, modificarán su patrón de expresión de acuerdo con el nivel de oxígeno bajo el cual se cultiven.
- La expresión de las isoformas angiogénicas y antiangiogénicas se correlacionarán positivamente con los complejos SRSF1/SRPK1 y SRSF6/CLK1, respectivamente.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Diseño Experimental

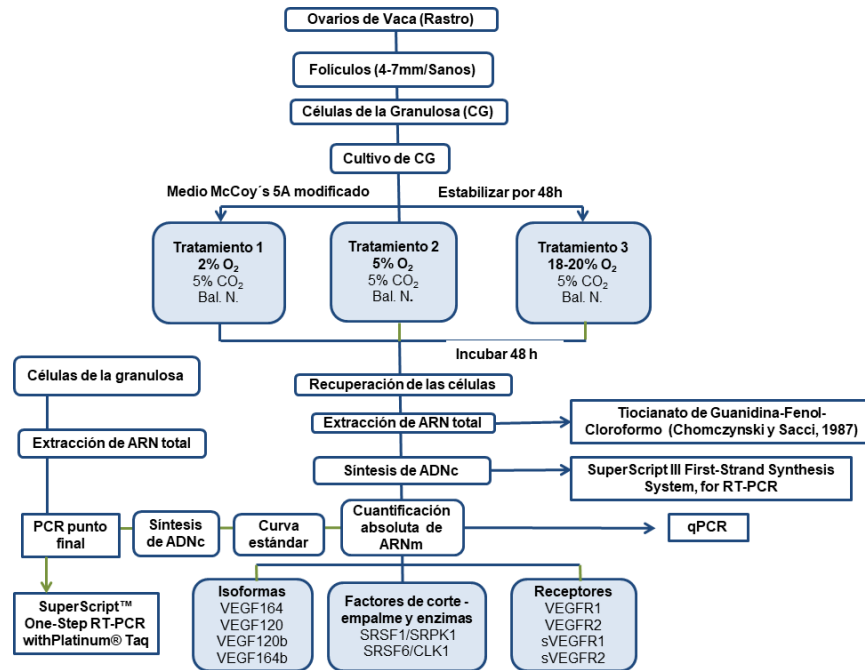


Figura 1. Diseño experimental para alcanzar los objetivos planteados.

6.2 Obtención de muestras biológicas

Los experimentos se realizaron en cultivos de células de la granulosa de bovinos. Para cada cultivo se recolectaron en promedio 16 ovarios de vacas Holstein, sacrificadas en un rastro municipal ubicado en Temamatla, Estado de México. Los ovarios se colectaron inmediatamente después del sacrificio de los animales en solución salina fisiológica (SSF) al 0.9% a 37°C, posteriormente se transportaron al laboratorio de Bioquímica de la Reproducción (UAM-X) en un tiempo no mayor a dos horas. Una vez en el laboratorio, los ovarios fueron lavados con SSF al 0.9% a 37°C y etanol al 75% por 30 seg. Por último los ovarios se colocaron en SSF al 0.9% y 50 mL de medio de cultivo McCoy's 5a modificado con bicarbonato (*in vitro*-ME-043) suplementado con los reactivos especificados en el Cuadro 1 y se conservaron en una estufa de cultivo a 37°C, durante el tiempo que duro la disección.

Se obtuvieron muestras de algunos tejidos en los cuales se ha reportado la expresión de la isoforma VEGF164b en otras especies, esto con el fin de usarlos como testigos positivos (Perrin *et al.*, 2005; VanKlombenberg *et al.*, 2016; Cheung *et al.*, 2017; Yakes *et al.*, 2017).

Se colectaron muestras de 5x5x5 cm de tejido de la zona cortical y de la zona medular de cotiledones placentarios, riñón, globo ocular de bovinos y glándula mamaria. Las muestras se obtuvieron inmediatamente después del sacrificio en solución PBS (Buffer Fosfato Salino) a 4°C y se realizaron dos lavados con la misma solución, posteriormente se transportaron a 4°C al laboratorio de Bioquímica de la Reproducción de la UAM-X. Se les realizó la extracción de ARN total por el método de tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo descrito por Chomczynski y Sacchi (1987), síntesis de ADNc y qPCR para la cuantificación absoluta de la isoforma VEGF164b, tal como se describe más adelante.

Cuadro 1. Suplementos del medio cultivo McCoy's 5a modificado con bicarbonato

Reactivos	Concentración
HEPES ¹	20 Mm
L-glutamina ²	3 mM
BSA ³	0.1%
Penicilina/ Estreptomicina ⁴	100 IU/0.1 mg/mL
Insulina ⁵	10 ng/mL
IGF-1 ⁶	1ng/mL
Androstenediona ⁷	10 ⁻⁷ M
Transferrina ⁸	2.5 ug/ml
Selenito (S5261-sigma) ⁹	4 ng/mL

¹ contiene (100g) C₈H₁₈N₂O₄S (H6147-sigma)

² contiene (100g) H₂NCOCH₂CH₂CH(NH₂)CO₂H (G8540-sigma)

³ contiene (10g) (A7030-sigma)

⁴ contiene (100 mL) (P4333-sigma)

⁵ contiene (50UG) (I3769-sigma)

⁶ contiene (50UG) (Gropel)

⁷ contiene (Donada por Departamento de Reproducción de la FMVZ de la UNAM)

⁸ contiene (T8158-sigma)

⁹ contiene (S5261-sigma)

6.3 Obtención y aislamiento de células de la granulosa de bovino

Bajo una campana de flujo laminar se diseccionaron y colectaron folículos de 4-7 mm en medio de cultivo previamente estabilizado (incubado por 3 h en una atmósfera de 18-20% de O₂, 5% de CO₂ a 37°C y 90% humedad), durante la disección se excluyeron los folículos claramente atrésicos (Rosales-Torres *et al.*, 2000; Rosales-Torres *et al.*, 2010). La disección de folículos se realizó sobre una caja Petri con medio de cultivo estabilizado y sobre una parrilla de calentamiento para mantener la temperatura de 35-37°C. Los sacos foliculares se abrieron para eliminar el líquido folicular y se realizó un raspado de la pared folicular para separar las células de la granulosa. Posteriormente las células se transfirieron a un tubo de 50 mL pasándolas por un filtro (Cell strainer FALCON a Corning Brand, 352350) y se centrifugaron a 1600 rpm por 10 min, decantando el sobrenadante para obtener un pellet de células. El primer lavado se realizó con 3 mL de medio de cultivo estabilizado y se centrifugaron a 1600 rpm por 10 min, decantando el sobrenadante. Para eliminar los eritrocitos se realizó un segundo lavado resuspendiendo el pellet de células en DPBS (Buffer Fosfato Salino de Dulbecco) 1X (*in vitro*-SS-05), agua inyectable (1:10), y se centrifugaron a 1600 rpm por 10 min, decantando el sobrenadante para obtener el pellet de células. Por último las células se resuspendieron en 3 mL de medio de cultivo estabilizado (Gutiérrez *et al.*, 1997).

El número de células de la granulosa se cuantificó tomando 10 µL de la suspensión celular y agregando 90µL de azul Tripán (4%). La mezcla se colocó en una cámara de Neubauer. El número de células viables totales se obtuvo con la siguiente fórmula:

Número de células totales = número de células x número de cuadrantes (5) x 10,000 x dilución (Hernández-Coronado *et al.*, 2015).

6.4 Cultivos de células de la granulosa

Las células se cultivaron en placas de 4 pozos con tapa (Thermo Fisher Scientific, NUNC estéril, 176740) con medio de cultivo McCoy's 5a modificado con bicarbonato y suplementado, previamente estabilizado. Se sembraron 500,000 células en 900 μ L por pozo y se estabilizaron por 48 h en una incubadora con una atmósfera con 18-20%, 5% de CO₂ a 37°C y 90% de humedad.

6.5 Tratamientos con Oxígeno (O₂)

Después de las 48 h de estabilización se realizó el recambio del medio de cultivo, retirando 700 μ L de medio de cultivo de cada pozo de la placa y agregando 700 μ L de medio previamente estabilizado. Posteriormente las placas se colocaron en jarras de anaerobiosis (Thermo Fisher Scientific, OXOID, HP0011A). Se utilizaron dos jarras de anaerobiosis cada una bajo las siguientes, condiciones: el tratamiento uno; 2% O₂, 5% CO₂, balance de nitrógeno y el tratamiento dos; 5% O₂, 5% CO₂, balance de nitrógeno. Las placas que se utilizaron como control se incubaron bajo condiciones atmosféricas de 18-20% O₂ y 5% CO₂. Las placas de las jarras de anaerobiosis y las placas control se incubaron por 48 horas más a 37°C y 90% humedad (Gutiérrez *et al.*, 1997). Posterior a las 48 horas de incubación bajo los diferentes niveles de oxígeno, las células se recuperaron y se almacenaron a -80 °C para posteriormente realizar la extracción de ARN total, la síntesis de ADNc y la qPCR para la cuantificación de VEGF120, VEGF164, VEGF120b, VEGF164b, SRSF1, SRPK1, SRSF6, CLK1, VEGFR1, VEGFR2, sVEGFR1 y sVEGFR2.

6.6 Extracción de ARN y síntesis de ADNc de células de la granulosa

Para este experimento se realizaron 3 cultivos independientes por cada nivel de oxígeno con células provenientes de ovarios y folículos distintos. La extracción del ARN total se realizó por tratamiento para cada una de las tres repeticiones usando el método de tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo descrito por (Chomczynski y Sacchi (1987). Para la extracción del ARN total, se utilizó de 0.4 mL de reactivo TRIzol™ (Invitrogen, Cat. No. 146 15596-018) por 1×10^5 - 10^7 de células de las placas de cultivo. Las células se lisaron con un homogeneizador de vidrio-vidrio (homogeneizador Heidolph 147, tipo RZR1). El ARN se cuantificó por espectrofotometría y la integridad se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

La síntesis de ADN complementario (ADNc) se realizó con el estuche comercial SuperScript III First-Strand Synthesis System, for RT-PCR (Invitrogen, Life Tchnology, No de Cat. 18080-051). Para la primera reacción se utilizó 1 µg de ARN total para cada muestra, 1 µM de poli-dT, 0.04 mM dNTPs y se colocó a 65°C por 5 min. Para la segunda reacción se utilizó 2 µL RT Buffer, 4 µL MgCl₂, 2 µL DTT, 1 µL RNase OUT, 1 µL de la enzima SuperScript III RT y se colocaron en el termociclador a 50°C por 50 min y 85°C por 5 min. Por último, se les agregó RNase H para eliminar remanentes de ARN.

6.7 Expresión de las isoformas y receptores de VEGF, los factores de corte y empalme y las enzimas que los fosforilan SRSF1/SRPK1 y SRSF6/CLK1

La expresión del ARNm de los genes de interés se realizó mediante PCR tiempo real (qPCR), utilizando cebadores y sondas Taqman diseñadas para cada uno de los genes (Cuadro 2). Las reacciones de qPCR se realizaron en tubos ependorf (Applied Biosystems, No. Cat. 4358293) en un volumen final de 20 µl mezclando: 9 µl de la muestra de ADNc a una dilución de 1:10 (VEGF120, VEGF164, VEGF120b, VEGF164b, SRSF1/SRPK1, SRSF6/CLK1, sVEGFR1, sVEGFR2) y 1:1 (VEGFR1,

VEGFR2), 10 µl del *master mix* de PCR universal TaqMan (Applied Biosystems, No. de Cat. 4324018) y 1 µl de solución con cebadores y las sondas (Cuadro 2). Se utilizó un termociclador Step One Plus (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: 50°C durante 2 minutos, 95°C durante 10 min y 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 60 segundos.

Cuadro 2. Secuencias de cebadores y sondas TaqMan específicas para VEGF120, VEGF120b, VEGF164, VEGF164b, SRPK1, SRSF1, CLK1, SRSF6, VEGFR1, VEGFR2, sVEGFR1 y sVEGFR2 de bovinos

Genes	Secuencia 5' - 3'	Amplicón (pb)	Número de acceso (genbank)
VEGF120	Delantero: GAGATGAGCTTCCTACAGCATAACAA Reverso: GCCTCGGCTTGTCACATTTTT Sonda: TGTGAATGCAGACCAAA	85	NM_1742 16.1
VEGF120b	Delantero: GATAAAGCAAGGCAAGAAAACG Reverso: TGGCGGCGGCTATGG Sonda: AAAGACTGACACAGAACTA	68	-
VEGF164	Delantero: GCAAGGCAAGAAAATCCCTGT Reverso: CGCCTCGGCTTGTCACAT Sonda: CGAGGCAGCTTGAGTTA	169	-
VEGF164b	Delantero: GCAAGGCAAGAAAATCCCTGT Reverso: TCCTGGTGAGACGTCTGCAA Sonda: CGAGGCAGCTTGAGTTA	159	-
SRPK1	Delantero: TGCCTCGCAAGCTCAT Reverso: GCCACTCATACTTCTCCACTAGAAC Sonda: ACATCACGAAGCTGAAACCCTGGG	129	XM_00269 7203
SRSF1	Adelante: CCTTCGTTGAGTTCGAGGAC Reverso: GCCGCTTCGAGGAAACT Sonda: CGCGACGGCTATGATTACGATGGA	107	NM_0010 76394.1
CLK1	Delantero: CCCTTTGACTGGATCATA Reverso: GTCTGTGTGAGTCAACTTACTG Sonda: CAGGAGGATGGCATAACAGATATGCA	91	NM_0011 02271.1
SRSF6	Delantero: TTTACGAGCTGAACGGCAA	135	NM_0010

	Reverso: AGGTTCTCCGACTGCTGTATC Sonda: TACAGCTACGGAAGCCGCAGTG		35272.1
VGFR1	Delantero: ATGCGAGCACCCGAGTATG Reverso: CTTTGTGCCAGCAGTCCAA Sonda: CTGAAATCTACCAGACCAT	68	NW_0014 93038
VEGFR2	Delantero: GCTGAAAACCCTGGAAGACA Reverso: ATGCCACAGACTCCTTGCTT Sonda: TTTTAGTGGACTGATGCCCA	65	X94298
sVEGFR1	Delantero: CATTAGAGGTGAGCACTGCAACA Reverso: TTCCTCGTGCTTTTAAATTTGGA Sonda: AAAGGCTGTTTTCTCTCGG	68	NW_0014 93038
sVEGFR2	Delantero: CTCAGGACAGGAAGACTAAGAAAAGAC Reverso: GTCCAGAGTGACTGCCCTACCTA Sonda: TTGTGTGGCCAGGCA	84	-

Para realizar una cuantificación absoluta se realizó una curva estándar amplificando cada gen con cebadores específicos (Cuadro 2) mediante PCR punto final utilizando el estuche comercial SuperScript™ One-Step RT-PCR withPlatinum® Taq (Invitrogen, LifeTechnology, No de Cat. 10928-042) siguiendo las instrucciones del proveedor. Para esta reacción se mezcló 1 µg de ARN total, 25 µl de 2X Reaction Mix, 1 µl de cebador sentido, 1 µl de cebador antisentido, 1 µl de RT /Platinum Taq, 0.6 µl de MgSO₄ (50 mM) y agua estéril para ajustar el volumen a 50 µl. La reacción se colocó en un termociclador (gradiente de Mastercycler, Eppendorf) en las siguientes condiciones: síntesis de ADNc y desnaturalización a 50°C durante 30 min y 94°C durante 2 min, y a continuación 40 ciclos con las siguientes condiciones: 94°C durante 15 seg, 60°C durante 30 seg y 70°C durante 60 seg y una extensión final de 72°C durante 10 minutos.

La amplificación de los genes se visualizó realizando una electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se identificó la banda que correspondía al gen de acuerdo al tamaño del amplicón. Se escindió del gel mediante corte y se purificó con el estuche comercial QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Número de cat. 28704).

Se cuantificó la concentración de ADNc de cada gen por espectrofotometría y se realizó una curva estándar con el número de copias por microlitro utilizando la siguiente fórmula: No. de Copias = Concentración de la muestra (g/mL) x Constante de Avogadro (6×10^{23}) /pares de bases x peso de una base (660 g/mol; Tricarico *et al.*, 2002). A partir de este cálculo se realizaron diluciones seriadas 1.11×10^{-3} hasta 1.11×10^{-9} .

6.8 Análisis Estadístico

Para analizar el efecto del nivel de oxígeno sobre la expresión de las isoformas VEGF164, VEGF120, VEGF120b, los factores de corte y empalme y las enzimas que los fosforilan SRSF1/SPK1 y SRSF6/CLK1, para los receptores de membrana VEGFR1, VEGFR2 y receptores solubles sVEFR1 y sVEGFR22 se utilizó un análisis de varianza utilizando el nivel de oxígeno (2%, 5%, y 20%) como variable fija, el cultivo como variable aleatoria y el número de copias de cada isoforma como variables dependientes. Se analizó la relación que existe la expresión de las isoformas VEGFxxx y VEGFxxx b con los respectivo los factores de corte y empalme y las enzimas que los fosforilan SRSF1/SRPK1 y SRSF6/CLK1 mediante análisis de varianza. Previo a esto se probó la normalidad y la homocedasticidad de los datos utilizando la prueba de Shaphiro-Wilk y de Levene respectivamente y las medias se compararon mediante una prueba de Tukey. Adicionalmente se utilizó un análisis de regresión lineal simple usando el nivel de oxígeno como variable "X" el número de copias de cada gen con variable "Y". Todos los análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico JMP-13.

VII. RESULTADOS

El análisis de regresión lineal simple muestra una reducción ($P \leq 0.05$) en la expresión del ARNm de VEGF120 ($R^2=0.75$), VEGF120b ($R^2=0.62$) y VEGF164b ($R^2=0.62$) con el incremento en el nivel de oxígeno. De manera específica, la expresión del ARNm de VEGF120, VEGF120b y VEGF164 fue mayor ($P \leq 0.05$) en células cultivadas con 2% de oxígeno en comparación con el 20% de oxígeno (Figura 2A-2C). Respecto a la isoforma VEGF164b, no se observaron concentraciones detectables de ARNm, en ninguno de los niveles de oxígeno evaluados en el presente experimento (Figura 2D). Para corroborar si la isoforma VEGF164b se expresa en bovinos, se determinó el número de copias del ARNm en otros tejidos de esta especie como cotiledón, riñón y retina. Los resultados muestran que en riñón el número de copias del ARNm de VEGF164b fue menor a 1000 copias, mientras que en glándula mamaria, cotiledones placentarios y retina, no se encontraron niveles detectables de la isoforma (Cuadro 3).

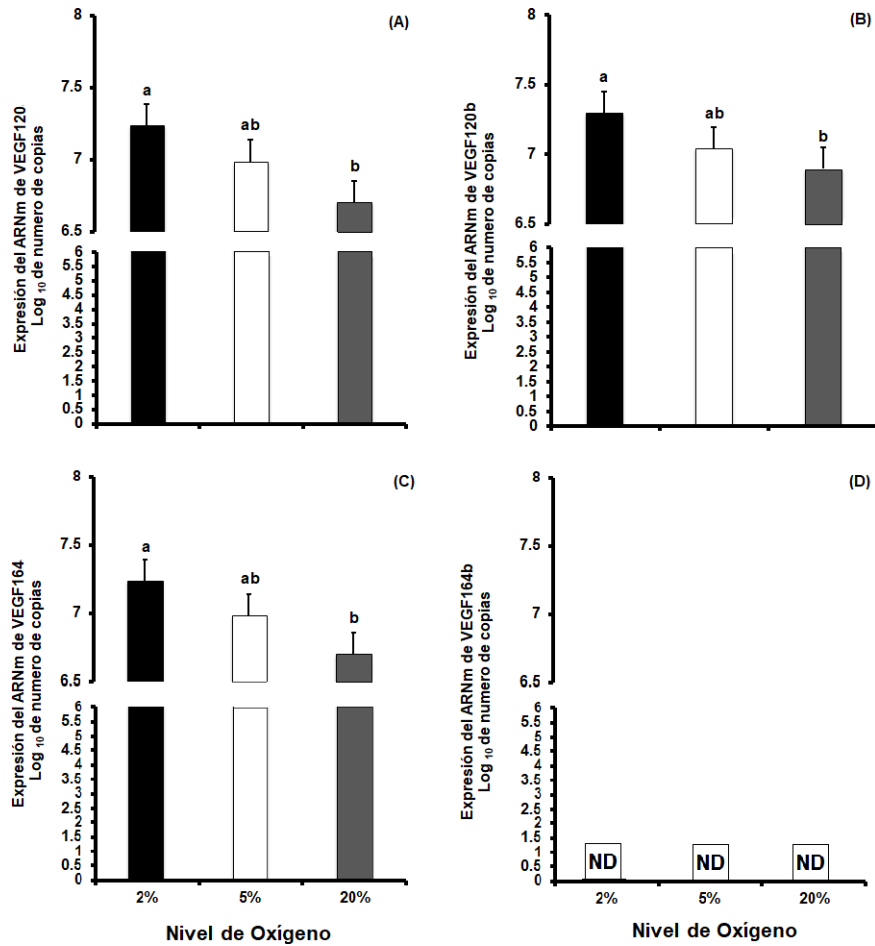


Figura 2. Expresión del ARNm de las isoformas VEGF120, VEGF164, VEGF120b y VEGF164b en células de la granulosa de bovino cultivadas a diferentes concentraciones de oxígeno, 5% CO₂, balance de nitrógeno a las 48 h

Cuadro 3. Expresión del ARNm de la isoforma VEGF164b en riñón, retina cotiledones y glándula mamaria de bovino

Tejido	No. Copias
Riñón	975±260
Retina	no amplificó
Cotiledones	no amplificó
Glándula mamaria	no amplifico

En cuanto al número de copias del ARNm de SRPK1, CLK1 y SRSF1, no se observó relación con los niveles de oxígeno ($P \geq 0.05$) y no se encontraron diferencias entre tratamientos (Figura 3A, 3C y 3D). Sin embargo, la expresión del ARNm del factor SRSF6 ($R^2 = 0.008$) mostró una reducción lineal con el incremento en el nivel de oxígeno ($P \leq 0.05$). De forma específica, la expresión del ARNm del factor SRSF6 fue menor ($P \geq 0.05$) en células cultivadas con 20% de oxígeno (Figura 3B).

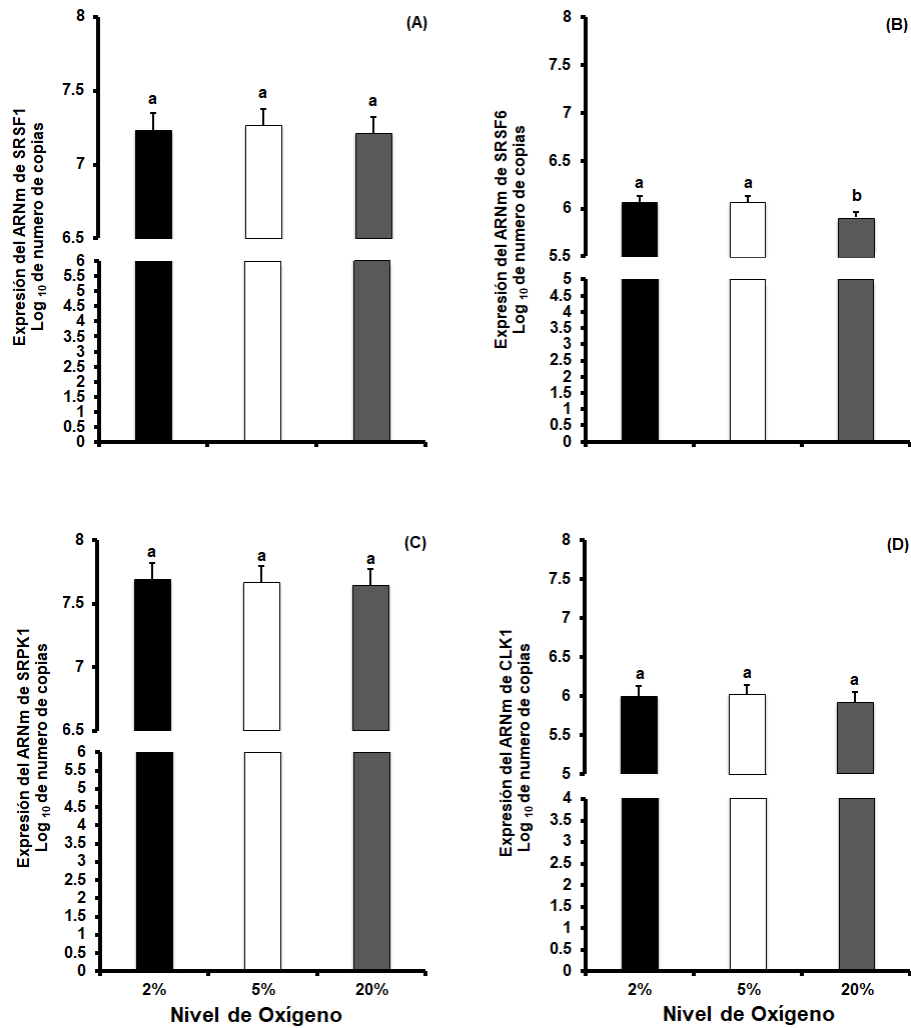


Figura 3. Expresión del ARNm de los factores de corte y empalme SRSF1 y SRSF6 y las enzimas SRPK1 y CLK1 en células de la granulosa de bovino cultivadas a diferentes concentraciones de oxígeno, 5% CO₂, balance de nitrógeno a las 48 h

Los cambios en la expresión del ARNm de los receptores de membrana y solubles de VEGF se muestran en la Figura 3. No se observó relación ($P \geq 0.05$) entre el número de copias del ARNm de VEGFR1 ($R^2=0.84$) y VEGFR2 ($R^2=0.60$) con el cambio en el nivel de oxígeno ni efecto del mismo sobre la expresión de estos genes (Figura 4A y 4B). Sin embargo, la expresión de los receptores solubles sVEGFR1 y sVEGFR2 mostró un incremento lineal ($P \geq 0.05$) en el número de copias del ARNm con el incremento de la concentración nivel de oxígeno. Ambos receptores solubles mostraron una mayor expresión ($P \leq 0.05$) del ARNm en cultivos con 20% en comparación con 2% de oxígeno (Figura 4C y 4D).

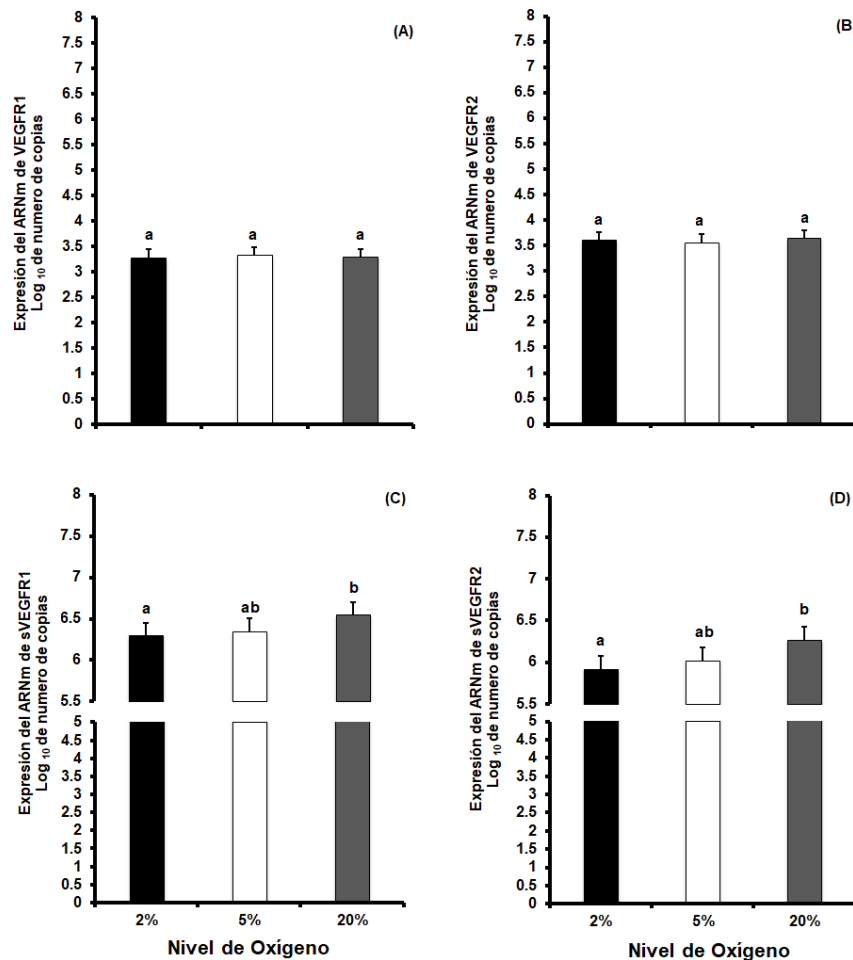


Figura 4. Expresión del ARNm de los receptores VEGFR1, VEGFR2, sVEGFR1 y sVEGFR2 en células de la granulosa de bovino cultivadas a diferentes concentraciones de oxígeno, 5% CO₂, balance de nitrógeno a las 48 h.

La relación que existe entre las isoformas VEGFxxx y VEGFxxx b con los respectivos factores de corte y empalme y las enzimas cinasas que los fosforilan se muestran en la Tabla 3. No se observó relación entre la mayor expresión de ARNm de los ligandos VEGF120, VEGF164 con el ARNm de los factores de corte y empalme y las enzimas que las fosforilan SRSF1/SRPK ($P > 0,05$). De igual forma entre la mayor expresión de ARNm del ligando VEGF120b y el ARNm de la enzima CLK1 ($P \geq 0,05$) sin embargo si hay relación con el ARNm factor de corte y empalme SRSF1 ($P \leq 0,05$).

Cuadro 4. Correlación entre ARNm de VEGF120, VEGF164 con el complejo SRSF1/SRPK1 y el ARNm de VEGF120b y VEGF164b con el complejo SRSF6/CLK1 en células de la granulosa de bovino cultivadas a diferentes concentraciones de oxígeno, 5% CO₂, balance de nitrógeno a las 48 h.

	VEGF120		VEGF164	
	R	Valor P	R	Valor P
SRSF1	0.2539	0.5098	0.2433	0.5282
SRPK1	0.0418	0.915	0.2948	0.4412
	VEGF120b		VEGF164b	
	R	Valor P	R	Valor P
SRSF6	0.6992	0.0361	-	-
CLK1	0.5381	0.135	-	-

VIII. DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo mostraron que la expresión del ARNm de las isoformas VEGF120, VEGF164 y VEGF120b fue mayor en células de la granulosa de bovino cuando se cultivaron con 2% de oxígeno en comparación con las células de la granulosa cultivadas a 20%. En contraste la expresión del ARNm de sVEGFR1 y de sVEGFR2 fue menor en los cultivos con 2% y aumentó conforme se incrementó el nivel de oxígeno (5 y 20%). Estos resultados sugieren que las células de la granulosa cultivadas con 2% de oxígeno desarrollan un medio endocrino proangiogénico (mayor expresión de VEGF y menor expresión de receptores solubles, sin cambios en receptores de membrana), lo cual seguramente favorece los efectos biológicos de VEGF. En contraste, las células cultivadas en normoxia (20% de oxígeno) desarrollan un medio antiangiogénico (menor expresión de ligandos y mayor expresión de receptores solubles) que bloquea la actividad de VEGF. Es importante señalar que en cultivo de células de la granulosa solo tuvo efecto negativo el nivel más alto de oxígeno (20%) en la expresión de SRSF6 y no se observó efecto en el factor SRSF1 ni en las enzimas que fosforilan a ambos factores de corte y empalme.

En este estudio la expresión del ARNm de las isoformas angiogénicas de VEGF fue mayor en células de la granulosa de bovino cultivadas con 2% de oxígeno. En cuanto a la expresión del ARNm de VEGF120 y VEGF164 fue 3.7 y 5.4 veces mayor respectivamente en células cultivadas con 2% de oxígeno en comparación con las células cultivadas con 20% de oxígeno. De manera similar, en cultivo de células de la granulosa de folículos de bovino (3-5 mm) la expresión del ARNm de VEGF en células cultivadas con 5% de oxígeno fue 0.8 veces mayor respecto a las células cultivadas con un 20% de oxígeno (Shiratsuki *et al.*, 2016). Los resultados reportados en cultivo de células endoteliales de vena umbilical de humano mostraron que la hipoxia causó un aumento de 65% en la expresión de ARNm VEGF165 y 42% en la expresión de VEGF121 (Balasubramanian *et al.*, 2001). De igual manera en cultivo de condrocitos de ratón, la expresión del Factor Inducido por Hipoxia-1 α (HIF-1 α) en condiciones de bajos niveles de oxígeno (0.5%) se correlacionó con un aumento en

la expresión de las isoformas VEGF120 y VEGF164 de 13.3 veces respecto a células cultivadas en condiciones de normoxia (20% de oxígeno; Cramer *et al.*, 2004).

Los mecanismos por los cuales la hipoxia regula la expresión de las isoformas de VEGF están asociados a la acción de HIF-1 α (Shannon *et al.*, 2003). El HIF-1 α está regulado por oxígeno, y en condiciones de normoxia sus niveles disminuyen por hidroxilación de sus residuos de prolina y asparagina, lo que permite el reconocimiento específico de la proteína Von Hippel-Lindau, seguido de la degradación por el proteosoma (Ginouves *et al.*, 2008). Sin embargo, en condiciones de hipoxia se inhibe la hidroxilación de HIF-1 α , consecuentemente no se degrada y forma un complejo heterodimérico con HIF-1 β (Adams *et al.*, 2009). El complejo HIF-1 α y HIF-1 β se unen a una región promotora de 256 pares de bases llamada elemento sensible a la hipoxia (HRE) del gen de VEGF (Javan y Shahbazi, 2007). De esta manera el HIF-1 se unen a HRE para promover la transcripción de VEGF (Shimizu y Miyamoto, 2007).

Las isoformas VEGF120 y VEGF164 estimulan la proliferación, la sobrevivencia y la migración principalmente en células endoteliales para promover la formación de vasos sanguíneos (Ferrara *et al.*, 2003). Sin embargo, la expresión de VEGF en tejidos como el cerebelo, próstata, islotes pancreáticos, entre otros permite suponer que las isoformas de VEGF tienen actividad más allá de la angiogénesis (Woolard *et al.*, 2004). En un experimento en ratas neonatales transfectadas en cerebro con VEGF, detectaron un aumento del número de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Sun *et al.*, 2010). En ratas Sprague-Dawley inyectadas con un antagonista de VEGF (VEGF Trap), la proliferación de las células de la granulosa disminuyó significativamente: control: 55.84% \pm 3.05%; VEG Trap: 36.40% \pm 2.37% (Abramovich *et al.*, 2010). En cultivos de células de la granulosa de ratas tratadas con VEGF (50 ng / ml y 100 ng / ml), presentaron un incremento en el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), y una disminución significativa en el patrón de fragmentación del ADN, característico de la apoptosis y del fragmento activo p17 de la caspasa 3 (Basal: 216.7 \pm 17.5; VEGF 50 ng / ml: 139,5 \pm 12,4; VEGF 100 ng / ml:

118,0 ± 24,7) resultando en un aumento de la proliferación y supervivencia de células de la granulosa (Irusta *et al.*, 2010).

Como lo he venido mencionando, la vasculatura folicular se limita únicamente a las células de la teca y dado que el suministro de oxígeno para las capas de células de la granulosa depende de la difusión a través de la membrana basal, estas células llevan a cabo sus procesos metabólicos en un ambiente con niveles bajos de oxígeno (Bianco *et al.*, 2005). Se ha documentado que el nivel de oxígeno en el líquido folicular oscila entre 1.1% a 5.5% y se ha demostrado experimentalmente que el aumento en el diámetro folicular está acompañado por una disminución en las concentraciones de oxígeno (Van Blerkom *et al.*, 1997). Un estudio donde se determinaron las concentraciones de oxígeno en líquido de folículos de mujer mostró que folículos <1mm de diámetro cuentan con 136.5mm/Hg; folículos entre 1 y 2 mm con 96.1mm/Hg y folículos >2 mm con 73.6 mm/Hg (Fischer *et al.*, 1992). Adicionalmente, en un modelo matemático de folículos de mujer se determinó que los niveles de oxígeno en líquido folicular es de 13 mm/Hg en folículos <4 mm de diámetro y 21mm/Hg en folículos ≥16 mm de diámetro (Redding *et al.*, 2008). De manera similar en líquido folicular de cerdas *in vivo* la presión parcial de oxígeno (pO₂) fue de 126.9 mm/Hg en folículos pequeños (<3mm), mientras que en folículos medianos (3-5mm) y grandes (>5mm) disminuyó a 93.4 mm/Hg y 67.7 mm/Hg respectivamente (Basini *et al.*, 2004). Con base en nuestros resultados y a todos estos antecedentes bibliográficos, podemos pensar que la hipoxia fisiológica en la que ocurre el desarrollo folicular es la condición propicia para que ocurra la mayor síntesis del ARNm de las isoformas más abundantes en todos los tejidos (VEGF120 y VEGF165) para que estas actúen de manera autócrina impulsando y favoreciendo la proliferación y supervivencia de las células de la granulosa necesarias para el crecimiento folicular.

Se conoce muy poco sobre el patrón de secreción que mantienen las isoformas VEGF_{xxx}, especialmente la proporción de estas isoformas respecto a las VEGF_{xxx} en los distintos tejidos y menos información existe para el caso de tejidos que no están directamente irrigados, como es el caso de las células de la granulosa. Las

isoformas antiangiogénicas representan una gran proporción del VEGF total que se expresa en tejidos normales, en ganglios de la raíz dorsal comprende más del 50%, en pulmón 82%, en colon 95%, en piel 95% y en el humor vítreo 66%. Mientras que en tejidos muy irrigados como la placenta, VEGF165b representa una pequeña porción del VEGF total (Biselli-Chicote *et al.*, 2012). En cultivo de trofoblastos de humano la producción de la proteína VEGF165b aumentó cuando los cultivos se desarrollaron con < 2% de oxígeno en comparación con 21% ($P < 0.05$; $1,8 \pm 0,033$ ng / ml vs $1,4 \pm 0,095$ ng / ml; Bills *et al.*, 2014). Sin embargo, no hubo cambios en la expresión del ARNm y la proteína de VEGFxxx entre cultivos de fibroblastos inducidos a hipoxia con cloruro de cobalto y bajo condiciones de normoxia, pero si hubo un efecto en la expresión del ARNm y la proteína de VEGFxxx (Barratt *et al.*, 2018). En los resultados de este estudio, el patrón de expresión del ARNm de VEGF120b fue similar al de las isoformas VEGF120 y VEGF164, aunque la proporción en la disminución de la expresión del ARNm de VEGF120b entre los cultivos con 2% vs 20% fue un poco menor que para VEGF120 y VEGF164 (2.6 vs 3.7 y 5.4 veces mayor en células cultivadas con 2% de oxígeno en comparación con células cultivadas con 20% de oxígeno). El papel fisiológico de las isoformas VEGFxxx parece ser contrario a las VEGFxxx y cabe señalar que los efectos inhibitorios o bloqueadores entre isoformas puede ocurrir aun entre isoformas con un número distinto de aminoácidos en sus proteínas, por ejemplo; La migración de células HUVEC fue inhibida por la adición de VEGF121b en células bajo el estímulo de VEGF165 o VEGF121. Tal parece que lo importante es que exista un balance entre VEGFxxx y VEGFxxx para frenar el exceso en la angiogénesis y propiciar el crecimiento controlado de los tejidos (Rennel *et al.*, 2009). Es probable entonces que, si en nuestros resultados no se observaron niveles detectables de VEGF164b en los cultivos de granulosa, el contrapeso para que ocurra el balance entre isoformas angiogénicas y antiangiogénicas para VEGF, esté a cargo de VEGF120b.

La función biológica de VEGF se produce a través del balance en la producción de isoformas angiogénicas y antiangiogénicas. La producción de isoformas VEGFxxx y VEGFxxx, es regulada en algunos tejidos por factores de corte y empalme ricos en

serina y arginina (SR), como son SRSF1 y SRSF6 (Manetti *et al.*, 2011). Cuando el factor SRSF1 es fosforilado por la enzima específica SRPK1, el corte y empalme se genera en el sitio proximal (8a), y cuando la enzima específica CLK1 fosforila al factor SRSF6, el corte y empalme se da en el sitio distal (8b; Liu y Cheng, 2013; Nowak *et al.*, 2010). Mientras que en células HeLa, el uso de un inhibidor de específico de SRPK1 redujo la expresión ARNm de VEGF165 y aumentó la expresión de VEGF165b (Amin *et al.*, 2011). Mientras que la inhibición de SRSF6 y CLK1 redujo la síntesis de VEGF165b, la transfección con SRSF6 en células del epitelio pigmentado de la retina produjo un aumento en la síntesis de VEGF165b (Nowak *et al.*, 2008). En el presente estudio no se observó efecto del nivel de oxígeno en los cultivos de células de la granulosa para la expresión del ARNm del factor SRSF1 ni de las enzimas SRPK1 y CLK1. Además no se observó relación entre las concentraciones de VEGF120 y VEGF164 con SRSF1 y SPRK1 o VEGF120b con CLK1. Solamente el ARNm de SRSF6 fue 1.16 y 1.09 veces mayor en células cultivadas con 2% y 5% de oxígeno, respectivamente, en comparación con 20% y se correlaciono positivamente con VEGF120b. En contraste con los resultados reportados en cultivos celulares de glioma, la expresión de ARNm de SRPK1 y SRSF1 fue 7.5 y 11 veces más baja en cultivos con 1-5% de oxígeno en comparación con las cultivadas con 20% de oxígeno (Wu *et al.*, 2013). La hipoxia es un factor importante que determina el sitio para el corte y empalme alternativo del pre-ARNm de VEGF a través de los factores o proteínas SR. En cultivo de células HeLa la hipoxia cambia el sitio de corte y empalme en los genes sensibles a la hipoxia, como VEGF, por la acción de las cinasas SR dependientes de HIF-1 α , lo que finalmente provoca la fosforilación de la proteína SR (Jakubauskiene *et al.*, 2015). En cultivo de células epiteliales de pigmento retiniano humano (ARPE-19) inducidas a hipoxia con 4-hidroxinenal (4-HNE), se observó un aumento de 3 veces en los niveles del ARNm de HIF-1 α y SRPK1, y una relación relativa del ARNm de VEGF165 (> 25 μ M; Yoon *et al.*, 2004). La expresión de los factores y enzimas para la regulación del sitio de corte y empalme también depende de la condición de los mismos, por ejemplo en células endoteliales de pulmón sano la expresión de SRSF1 y SRPK1 fue 3.3 veces menor que en células endoteliales de células

tumorales (Wagner *et al.*, 2019). De igual manera, en tejidos cancerosos de mama, colon, tiroides, intestino delgado, riñón y pulmones, la expresión de ARNm y proteínas para SRSF1 es 2 veces mayor que en tejidos sanos (Karni *et al.*, 2007). Es claro que los procesos de corte y empalme alternativo están estrictamente regulados de manera específica dependiendo del tipo de célula, etapa de desarrollo y condición de salud de los tejidos (Smith y Valcárcel 2000). Teniendo esto en cuenta, es probable que, si en este estudio no vimos efectos del nivel de oxígeno sobre la expresión de SRSF1, SRPK1 y CLK1 pueda ser debido a la adaptación que tienen las células de la granulosa a la hipoxia, condición en la cual se desarrollan normalmente. Sin embargo dado que el nivel de oxígeno afecta la expresión de VEGF120, VEGF164 y VEGF120b entonces es posible que en las células de la granulosa que viven una hipoxia fisiológica existan otros factores que influyan en la expresión de VEGFxxx o VEGFxxx b.

Nuestros resultados indican que el nivel de oxígeno en los cultivos de células de la granulosa no modifica la expresión del ARNm de los receptores de membrana VEGFR1 y VEGFR2. Los reportes en la bibliografía relacionados con los efectos de la hipoxia en la expresión del ARNm de VEGFR1 y VEGFR2 son variables y contradictorios. En cultivos de células microvasculares endoteliales de colon humano (HCMEC), la expresión del ARNm de VEGFR1 y VEGFR2 no presentó diferencias cuando los cultivos fueron sometidos a condiciones de normoxia (21% de oxígeno) o hipoxia (3% de oxígeno; Jayasinghe, 2008). En otro estudio en células endoteliales capilares de bovino, células endoteliales de la vena safena y células endoteliales de arteria pulmonar humana cultivadas con 0.5% de oxígeno presentaron 2.5 veces mayor expresión del ARNm de VEGFR1 que cuando fueron cultivadas con 21% de O₂, mientras que las células endoteliales microvasculares dérmicas humanas presentaron mayor expresión del ARNm de VEGFR2 (Nilsson *et al.*, 2004). La expresión del ARNm y la proteína de VEGFR1 en cultivo de células (HMVEC), no mostró cambios por efecto de hipoxia (2.5% vs 21% de oxígeno; Ikeda *et al.*, 2011). Otras evidencias indican que, en células endoteliales de diferentes tejidos, existe un marcado efecto de la hipoxia sobre el incremento en los niveles de la proteína de

VEGFR1 y su forma soluble, así como una marcada disminución en la proteína de VEGFR2. La explicación a la diferencia en el comportamiento de estas proteínas puede ser que el gen que codifica VEGFR1 está regulado por la hipoxia, a través de elementos sensibles a la hipoxia (HRE) ubicados en la región del promotor (Gerber *et al.*, 1997; Ulyatt *et al.*, 2011). Por el contrario, en el gen de VEGFR2 no se han encontrado estos HRE (Gerber *et al.*, 1997; Olszewska-Pazdrak *et al.*, 2009), lo cual sugiere que en los tejidos donde existen efectos de la hipoxia en la expresión de VEGFR2, estos pueden deberse a mecanismos postraduccionales (Ho *et al.*, 2012; Brogi *et al.*, 1996). Existen evidencias de que la hipoxia celular regula la expresión génica a través de mecanismos transcripcionales y postranscripcionales. En condiciones normales de oxígeno, la proteína von Hippel Lindau debe unirse a HIF-1 α marcándola para que sea reconocida por el proteosoma para su degradación (Adams *et al.*, 2009). En cultivo de células HUVEC bajo condiciones de hipoxia crónica se observó una disminución significativa del ARNm y desestabilización de la proteína Dicer, la cual es dependiente de von Hippel Lindau y está encargada de silenciar la expresión del ARN de genes sensibles a la hipoxia (sVEGFR1, VEGFR1, VEGFR2, entre otros) a través de la modulación de micro ARNs (Ho *et al.*, 2012). En estos cultivos, la hipoxia crónica produjo la disminución de ARNm y de la proteína Dicer, de manera que bajo condiciones de hipoxia se produce una mayor expresión de sVEGFR1, VEGFR1, VEGFR2 y HIF1 α (Ho *et al.*, 2012). Si el efecto de la hipoxia en la expresión de los receptores es solo postranscripcional, nos ayuda a explicar por qué nosotros no observamos cambios en la expresión de los ARNm de VEGFR1 y VEGFR2, o bien a que los tejidos no endoteliales, como el caso de las granulosa, responden de manera diferente al oxígeno que los rodea.

Todo parece indicar que en la regulación de la acción biológica de VEGF, además de las isoformas VEGFxxx y VEGFxxx_b del ligando, importa mucho la relación que guarden los receptores de membrana respecto a las formas solubles. Entonces, si bien en nuestro estudio no se detectaron cambios en la expresión del ARNm de VEGFR1 y VEGFR2, si se observó un claro efecto del nivel de oxígeno en la expresión de sVEGFR1 y sVEGFR2 en las células de la granulosa. Ulyatt *et al.*, (2011) muestran que la hipoxia prolongada en las células endoteliales estimula la

síntesis de proteínas solubles de los receptores para VEGF, lo cual afecta la señalización intracelular y la migración celular, estos autores reportan que el cultivo de células (HUVEC) en condiciones de hipoxia (1-5% de oxígeno) presentaron un aumento de 2.8 veces en el nivel de la proteína de sVEGFR1, en comparación con las células cultivadas en condiciones de normoxia (20% de oxígeno).

Los receptores solubles especialmente sVEGFR-1 por su mayor afinidad al ligando, inhiben la actividad biológica de VEGF, y pueden actuar como reguladores fisiológicos negativos (Góralczyk *et al.*, 2015; Kendall y Thomas, 1993). Algunas evidencias *in vivo* indican, que en ratones con tumores transfectados con sVEGFR1 se inhibe la angiogénesis tumoral (Kou *et al.*, 2004). De manera similar, en córnea normal de humano, se determinó por inmunoprecipitación que esta se mantiene avascular debido a que VEGF se encuentra unido a los receptores sVEGFR1 (Ambati *et al.*, 2007). La lisis del cuerpo lúteo está regulada por la reducción en la proporción de VEGFR2 / sVEGFR2, mientras que el aumento en sVEGFR2 ($P < 0.001$) se asocia con el inicio de la luteólisis (Guzmán *et al.*, 2015). De acuerdo a nuestros resultados, la expresión del ARNm de sVEGFR1 y sVEGFR2 se redujo 1.9 y 2.2 veces en células cultivadas con 2% vs 20% de oxígeno. De manera similar, en cultivo de células endoteliales microvasculares de humano se demostró que el nivel de expresión de ARNm del receptor sVEGFR1 fue 1.6 veces menor cuando los cultivos se realizaron con 1% de oxígeno en comparación con 20% (Ikeda *et al.*, 2011). Con base en lo anterior, proponemos que la baja expresión de los receptores sVEGFR1 y sVEGFR2 en células de la granulosa cultivadas con 2-5% de oxígeno, permite una mayor biodisponibilidad de VEGF para su unión a los receptores de membrana.

Los mecanismos por los cuales se regula la expresión de sVEGFR1 aún no se han aclarado por completo (Ikeda *et al.*, 2011). Los resultados disponibles con respecto a la expresión de sVEGFR1 bajo condiciones de hipoxia son variables dependiendo del tipo de tejido. Algunos estudios han demostrado que la hipoxia conduce a un aumento en la secreción de los receptores solubles en cultivo de células de

citotrofoblasto cultivadas con 2% de oxígeno, además conduce a un aumento en la expresión del ARNm (9.30 ± 3.24 veces) de sVEGFR1 en contraste con las células cultivadas con 20% de oxígeno (Nagamatsu *et al.*, 2004). Adicionalmente se ha reportado que al inhibir la expresión de HIF-1 α con PHD (prolil hidroxilasa) en células HMVEC en cultivo bajo condiciones de hipoxia inducida (1-2.5% de oxígeno) con DMOG (*Dimetiloxaloliglicina*), no se encontraron diferencias significativas en la expresión de los receptores solubles y de membrana para VEGF, concluyendo que HIF-1 α no está directamente involucrado en la expresión de sVEGFR1 (Ikeda *et al.*, 2011). En cultivo celular de macrófagos provenientes de ratones knockout para HIF-1 α se vio que la hipoxia aumentó la expresión del ARNm de sVEGFR1, concluyendo que este receptor depende de la expresión de HIF-2 α (Eubank *et al.*, 2011). Los diferentes tipos de células de un órgano pueden responder de manera distinta a los cambios en la presión de oxígeno (Ho *et al.*, 2012). En tejidos de ratón (timo, cerebro, testículo, ovario, pulmón, corazón e hígado) la expresión de sVEGFR1 puede variar hasta un 3.5 veces entre tejidos (Huckle y Roche, 2004). El tipo de tejido representa una diferencia en los efectos del oxígeno sobre la expresión de estos receptores.

IX. CONCLUSIÓN

Un ambiente con bajos niveles de oxígeno (2%) favorece la mayor expresión del ARNm de VEGF120, VEGF164 y VEGF120b en células de la granulosa de bovino en cultivo, y la expresión más baja del ARNm de sVEGFR1 y sVEGFR2, con lo cual seguramente se propicia un medio autocrino que favorece los efectos proliferativos y de supervivencia de las células de la granulosa. Además, es probable que la condición de hipoxia fisiológica en la que viven las células de la granulosa *in vivo* produzca un ambiente similar a lo que observamos en este experimento y con ello se favorezca el desarrollo folicular.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Abou-Fayçal C., Hatat, AS., Gazzeri S., Eymin B. 2017. Splice variants of the RTK family: their role in tumour progression and response to targeted therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 18:1-19
- Aerts JMJ., Bols PEJ. 2010. Ovarian follicular dynamics: A review with emphasis on the bovine species. Part I: folliculogenesis and pre-antral follicle development. *Reproduction in Domestic Animals.* 45(1):171-179.
- Aerts JMJ., Bols PEJ. 2010. Ovarian follicular dynamics. A review with emphasis on the bovine species. Part II: antral development, exogenous influence and future prospects. *Reproduction in domestic animals.* 45(1):180-187.
- Alberts, B. (Ed.5), 2008. *Molecular biology of the cell*, 5th ed. Garland Science, New York.
- Appel S., Turnwald EM., Ankerne J., Wohlfarth M., Appel J., Rother E., Janoschek R., Alcazar MAA., Schnare M., Meibner U., Dötsch J. 2015. Hypoxia-mediated soluble Fms-Like tyrosine kinase 1 increase is not attenuated in interleukin 6-deficient mice. *Reproductive Sciences.* 22(6):735-742.
- Araki S., Dairiki R., Nakayama Y., Murai A., Miyashita R., Iwatani M., Nomura T., Nakanishi O. 2015. Inhibitors of CLK protein kinases suppress cell growth and induce apoptosis by modulating pre-mRNA splicing. *PLOS ONE.* 10(1):1-18.
- Araki Y. 2003. Formation and structure of mammalian ovaries. *Introduction to Mammalian Reproduction.* 141-153.
- Ash JD., Overbeek P A. 2000. Lens-specific VEGF-A expression induces angioblast migration and proliferation and stimulates angiogenic remodeling. *Dev. Biol.* 223: 383–398.

- Aubol BE., Plocinik RM., Hagopian JC., Ma CT., McGlone, ML., Bandyopadhyay R., Fu XD., Adams JA. 2013. Partitioning RS domain phosphorylation in an SR protein through the CLK and SRPK protein kinases. *J. Mol. Biol.* 425, 2894-2909.
- Bates DO., Cui T., Doughty JM., Winkler M., Sugiono M., Shields JD., Peat D., Gillatt D., Harper SJ. 2002. VEGF165b, an inhibitory splice variant of Vascular Endothelial Growth Factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Research.* 62 (14):4123-4131.
- Bruns AF., Herbert SP., Odell AF., Jopling HM., Hooper NM., Zachary IC., Walker JH., Ponnambalam S. 2010. Ligand-stimulated VEGFR2 signaling is regulated by coordinated trafficking and proteolysis. *Traffic.* 11:161–174.
- Bianco F., Basini G., Grasselli F. 2005. Angiogenic activity of swine granulosa cells: effects of hypoxia and Vascular Endothelial Growth Factor trap R1R2, a VEGF blocker. *Domestic Animal Endocrinology.* 28(3):308-319.
- Biselli-Chicote PM., Oliveira ARCP., Pavarino EC., Goloni-Bertollo EM. 2012. VEGF gene alternative splicing: pro- and anti-angiogenic isoforms in cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology.* 138(3):363-370.
- Bruno JB., Matos MHT., Chaves R.N., Celestino JJH., Saraiva MVA., Lima-Verde IB., Araújo VR., Figueiredo JR. 2009. Angiogenic factors and ovarian follicle development. 6(2):371-379.
- Byrne AM., Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. 2005. Angiogenic and cell survival functions of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* 9(4):777-794.
- Calado AM., Oliveira E., Colaco A., Sousa M. 2011. Ultrastructural and cytochemical characterization of follicular cell types in bovine (*Bos taurus*) cumulus-oocyte

- complexes aspirated from small and médium antral follicles during the estrus cycle. *Animal Reproduction Science*. 123(1-2):23-31.
- Chang H., Qiao J., Leung PCK. 2016. Oocyte-somatic cell interactions in the human ovary novel role of bone morphogenetic proteins and growth differentiation factors. *Human Reproduction Update*. 23(1):1-18.
- Cheung CY., Anderson DF., Brace RA. 2017. Transport-associated pathway responses in ovine fetal membranes to changes in amniotic fluid dynamics. *Physiol*. 5: e13455.
- Chomczynski P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. 162(1):156-159.
- Clark LJ., Irving-Rodgers HF., Dharmarajan AM., Rodgers RJ. 2004. Theca interna: the other side of bovine follicular atresia. *Biology of Reproduction*. 71(4):1071-1078.
- Datta SR., Dudek H., Tao X. Masters S., Fu H., Gotoh Y., Greenberg ME. 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cellintrinsic death machinery. *Cell*. 91: 231-241.
- Dehghanian F., Hojati Z., Kay M. 2014. New insights into VEGF-A alternative splicing: key regulatory switching in the pathological process. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*. 6(4):192-198.
- Ellis L. 2001. Overview of angiogenesis: Biologic implications for antiangiogenic therapy. *Semin. Oncol*. 28: 94-104.
- Espinoza-Villavicencio JL., Pérez RO., Espinosa AP., Méndez JV., Flores CFA. 2007. Crecimiento folicular ovárico en animales domésticos: una revisión. *Interciencia*. 32(2):93-99.
- Evans ACO. 2003. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reproduction in Domestic Animals*. 38(4):240-246.

- Fair T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science*. 78(3-4):203-216.
- Ferrara N., Davis-Smyth T. 1997. The biology of Vascular Endothelial Growth Factor. *Endocrine Reviews*. 18(1):4-25.
- Ferrara N., Frantz G., LeCouter J., Dillard-Telm L., Pham T., Draksharapu A., Giordano T., Peale F. 2003. Differential expression of the angiogenic factor genes Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and endocrine gland derived VEGF in normal and polycystic human ovaries. *The American Journal of Pathology*. 162(6):1881-1893.
- Ferrara, N., 2004. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic science and clinical progress. *Endocr. Rev.* 25, 581-611.
- Fierro I.M., Kutok J.L., Serhan C.N., 2002. Novel lipid mediator regulators of endothelial cell proliferation and migration: aspirin-triggered-15 R -lipoxin A 4 and lipoxin A 4. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300: 385-392.
- Friberg PA., Larsson JDG., Billig H. 2008. Nuclear progesterone receptor mediated regulation of apoptosis in rat periovulatory granulosa cells. *Biology of Reproduction*. 78(1):171-171.
- García GA., Mejía Ó., García A. 2005. Biología y Patobiología Humana de la angiogénesis y la vasculogénesis. *Rev. Univ. Ind. Santander*. 37(3):157-165.
- Gammons MV., Dick AD, Harper SJ., Bates DO. 2013. SRPK1 inhibition modulates VEGF splicing to reduce pathological neovascularization in a rat model of retinopathy of prematurity. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 54(8):5797-5806.
- Gook DA., Edgar DH, Lewis K., Sheedy JR, Gardner DK. 2014. Impact of oxygen concentration on adult murine pre-antral follicle development *in vitro* and the corresponding metabolic profile. *Molecular Human Reproduction*. 20(1):31-41.

- Grasselli F., Basini G., Bussolati S., Tamanini C. 2002. Effects of VEGF and BFGF on proliferation and production of steroids and nitric oxide in porcine granulosa cells. *Reproduction in Domestic Animals*. 37(6):362-368.
- Greenaway J., Connor K., Pedersen HG, Coomber BL, LaMarre J., Petrik J. 2004. Vascular Endothelial Growth Factor and its receptor, Flk-1/KDR, are cytoprotective in the extravascular compartment of the ovarian follicle. *Endocrinology*. 145(6):2896-2905.
- Gu F., Li X., Kong J., Pan B., Sun M., Zheng L., Yao Y. 2013. VEGF111b a new member of VEGFxxx isoforms and induced by mitomycin C, inhibits angiogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 441: 18-24.
- Gutiérrez CG., Campbell BK., Webb R. 1997. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to Follicle-stimulating Hormone, and morphological characteristics. *Biology of Reproduction*. 56(3):608-616.
- Guyot M., Hilmi C., Ambrosetti D., Merlano M., Lo Nigro C., Durivault J, Grépin R., Pàges G. 2016. Targeting the pro-angiogenic forms of VEGF or inhibiting their expression as anti-cancer strategies. *Oncotarget*. 8(6):9174-9188.
- Guzmán A., Macías-Valencia R., Fierro-Fierro F., Gutiérrez CG., Rosales-Torres AM. 2015. The corpora lutea proangiogenic state of VEGF system components is turned to antiangiogenic at the later phase of the oestrous cycle in cows. *Animal*. 9(2):301-307.
- Harper SJ., Bates DO. 2008. VEGF-A splicing: the key to antiangiogenic therapeutics?. *Nature Reviews Cancer*. 8(11):880–887.
- Harvey SE., Cheng C. 2016. Methods for characterization of alternative RNA splicing. *Methods in Molecular Biology*. 1402: 229-241.
- Hatcher JM., Wu G., Zeng C., Zhu J., Meng F., Patel S., Wang W., Ficarro SB., Leggett AL., Powell CE., Marto JA., Zhang K., Ngo JCK., Fu X.,

- Zhang T., Gray NS. 2018. SRPKIN-1: A covalent SRPK1/2 inhibitor that potently converts VEGF from pro-angiogenic to anti-angiogenic isoform. *Cell Chemical Biology*. 25(4):460-470.
- Hayakawa K., Pham LDD., Som AT., Lee BJ., Guo S., Lo EH., Arai K. 2011. Vascular Endothelial Growth Factor regulates the migration of oligodendrocyte precursor cells. *J. Neurosci*. 31, 10666-10670
- Hernández-Coronado CG., Guzmán A., Espinosa-Cervantes R., Romano MC., Verde-Calvo JR., Rosales-Torres AM. 2015. Sphingosine-1-phosphate and ceramide are associated with health and atresia of bovine ovarian antral follicles. *Animal*. 9(2):308-312.
- Hellström M., Gerhardt H., Kalén M., Li X., Eriksson U., Wolburg H., Betsholtz C., 2001. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J. Cell Biol*. 153: 543-554.
- Holmes K., Roberts OL., Thomas AM., Cross MJ. 2007. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cellular Signalling*.19(10):2003–2012.
- Hu J., Zhang Z., Shen W., Azhar S. 2010. Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutrition & Metabolism*. 7(1):47.
- Hummitzsch K., Hatzirodos N., Irving-Rodgers HF., Hartanti MD., Perry VEA., Anderson RA., Rodgers RJ. 2019. Morphometric analyses and gene expression related to germ cells, gonadal ridge epithelial-like cells and granulosa cells during development of the bovine fetal ovary. *Plos One*.14 (3):71-79.
- Hummitzsch K., Irving-Rodgers HF., Hatzirodos N., Bonner W., Sabatier L., Reinhardt DP., Sado Y., Ninomiya Y., Wilhelm D., Rodgers RJ. 2013. A new model of development of the mammalian ovary and follicles. *Plos One*. 8(2):1-16.

- Irusta G., Abramovich D., Parborell F., Tesone M. 2010. Direct survival role of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) on rat ovarian follicular cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 325(1-2):93-100.
- Irving-Rodgers H.F., Rodgers R.J. 2005. Extracellular matrix in ovarian follicular development and disease. *Cell and Tissue Research*. 322(1):89-98.
- Jaffe LA., Egbert JR. 2017. Regulation of mammalian oocyte meiosis by intercellular communication within the ovarian follicle. *Annual Review of Physiology*. 79(1):237-260.
- Jamros MA., Aubol BE., Keshwani MM., Zhang Z., Stamm S., Adams, JA. 2015. Intra-domain cross-talk regulates Serine-arginine protein kinase 1- dependent phosphorylation and splicing function of transformer 2β1. *J. Biol. Chem*. 290:17269-17281.
- Joukov V., Pajusola K., Kaipainen A., Dmitri Chilov D., Lahtinen I., Kukk E., Saksela O., Kalkkinen N., Alitalo K. 1996. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *The EMBO Journal*. 15(2): 290-298
- Jussila L., Alitalo K., 2002. Vascular Growth Factors and lymphangiogenesis. *Physiol. Rev*. 82: 673-700.
- Kaczmarek MM., Schams D., Ziecik, A.J., 2005. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology—an overview. *Reprod Biol* 5: 111-136.
- Kedem A., Fisch B., Garor R., Ben-Zaken A., Gizunterman T., Felz C., Ben-Haroush A., Kravarusic D., Abir R. 2011. Growth Differentiating Factor 9 (GDF9) and bone morphogenetic protein 15 both activate development of human primordial follicles *in vitro*, with seemingly more beneficial effects of GDF9. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 96(8):1246-1254.

- Kelemen O., Convertini P., Zhang Z., Wen Y., Shen M., Falaleeva M., Stamm S., 2013. Function of alternative splicing. *Gene* 514: 1-30.
- Koch S., Tugues S., Li X., Gualandi L., Claesson-Welsh L. 2011a. Signal transduction by Vascular Endothelial Growth Factor Receptors. *Biochemical Journal*. 437(2):169-183.
- Konopatskaya O., Churchill AJ., Harper SJ., Bates DO., Gardiner TA., 2006. VEGF165b, an endogenous C-terminal splice variant of VEGF, inhibits retinal neovascularization in mice. *Mol. Vis.* 12: 626-632.
- Kosaka N., Sudo N., Miyamoto A., Shimizu T. 2007. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) suppresses ovarian granulosa cell apoptosis *in vitro*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 363(3):733-737.
- Kou B., Li, Y., Zhang L., Zhu G., Wang X., Li Y., Xia J., Shi Y. 2004. In vivo inhibition of tumor angiogenesis by a soluble VEGFR-2 fragment. *Exp. Mol. Pathol.* 76: 129-137.
- Kranc W., Chachuła A., Bryja A., Ciesiółka S., Budna J., Wojtanowicz-Markiewicz K., Sumelka E., Borys S., Antosik P., Bukowska D., Bruska M., Nowicki M., Kempisty B. 2016. Selected molecular and physiological aspects of mammalian ovarian granulosa cells in primary culture. *Medycyna Weterynaryjna*. 72(12):723-727.
- Lai MC., Lin RI., Tarn WY., 2003. Differential effects of hyperphosphorylation on splicing factor SRp55. *Biochem. J.* 371, 937–945.
- Laitinen M., Ristimäki A., Honkasalo M., Narko K., Paavonen K., Ritvos O. 1997. Differential hormonal regulation of Vascular Endothelial Growth Factors VEGF, VEGF-B, and VEGF-C messenger ribonucleic acid levels in cultured human granulosa-luteal cells. *Endocrinology*. 138(11):4748-4756.
- Li W., Li C., Chen S., Sun L., Li H., Chen L., Zhou X. 2018. Effect of inhibin A on proliferation of porcine granulosa cells *in vitro*. *Theriogenology*. 114:136-142.

- Magoffin DA. 2005. Ovarian theca cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 37(7):1344-1349.
- Mamsen LS., Brchner CB., Byskov AG., Mllgard K. 2012. The migration and loss of human primordial germ stem cells from the hind gut epithelium towards the gonadal ridge. *The International Journal of Developmental Biology*. 56(12):771-778.
- Martelli A., Russo V., Mauro A., Di Giacinto O, Nardinocchi D, Mattioli M. 2017. Insights into Ovarian Follicle Angiogenesis: Morphological and Chronological Vascular Remodeling from Primordial to Ovulating Follicles. *SM Vasc Med*. 2017; 2(1): 1009.
- McFee RM., Rozell TG, Cupp AS. 2012. The balance of proangiogenic and antiangiogenic VEGFA isoforms regulate follicle development. *Cell and Tissue Research*. 349 (3):635–647.
- Megan S., Sebastian O. 2018. Modulation of VEGF-A alternative splicing as a novel treatment in chronic kidney disease. *Genes* 9: 98.
- Mihm M., Evans ACO. 2008. Mechanisms for dominant follicle selection in monovulatory species: a comparison of morphological, endocrine and intraovarian events in cows, mares and women. *Reproduction in Domestic Animals*. 43:48-56.
- Noseir WMB. 2003. Ovarian follicular activity and hormonal profile during estrous cycle in cows: the development of 2 versus 3 waves. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 1:1-6.
- Nowak DG., Woolard J., Amin EM., Konopatskaya O., Saleem MA., Churchill AJ, Lodomery MR, Harper SJ, Bates DO. 2008. Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors. *Journal of Cell Science*. 121(20):3487-3495.

- Nowak DG., Amin EM., Rennel ES., Hoareau-Aveilla C., Gammons M., Damodoran G., Hagiwara M., Harper SJ., Woolard J., Lodomery MR., Bates DO., 2010. Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) splicing from pro-angiogenic to anti-angiogenic Isoforms: A novel therapeutic strategy for angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 285: 5532–5540.
- Oktem O., Oktay K. 2008. *The ovary. Annals of the New York Academy of Sciences.* 1127(1):1-9.
- Ortega SPV., Guzmán A., Hernández-Coronado CG., Castillo-Juárez H., Rosales-Torres AM. 2016. Reduction in the mRNA expression of sVEGFR1 and sVEGFR2 is associated with the selection of dominant follicle in cows. *Reproduction in Domestic Animals.* 51(6):985–991.
- Pan XY., Zhang ZH., Wu LX., Wang ZC. 2015. Effect of HIF-1 α /VEGF signaling pathway on plasma progesterone and ovarian prostaglandin F2 α secretion during luteal development of pseudopregnant rats. *Genetics and Molecular Research.* 14(3):8796–8809.
- Patel S., Zhou C, Rattan S., Flaws JA. 2015. Effects of endocrine-disrupting chemicals on the ovary. *Biology of Reproduction.* 93(1):1-9.
- Perrin RM., Konopatskaya O., Qiu Y., Harper S., Bates DO., Churchill AJ. 2005. Diabetic retinopathy is associated with a switch in splicing from antitoxin to pro-angiogenic isoforms of Vascular Endothelial Growth Factor. *Diabetologia.* 48(11): 2422-2427.
- Rodgers RJ., Irving-Rodgers HF. 2010. Morphological classification of bovine ovarian follicles. *Reproduction.* 139(2):309-318.
- Rodgers RJ., Irving-Rodgers HF., Van Wezel IL. 2000. Extracellular matrix in ovarian follicles. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 163(1-2):73-79.

- Rolaki A., Coukos G., Loutradis D., DeLisser HM., Coutifaris C., Makrigiannakis A. 2007. Luteogenic hormones Act through a Vascular Endothelial Growth Factor-Dependent mechanism to up-regulate $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$ integrins, promoting the migration and survival of human luteinized granulosa cells. *The American Journal of Pathology*. 170(5):1561-1572.
- Rosales-Torres AM., Guzmán AS. 2012. Importancia del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) y de sus receptores en el ciclo ovárico: Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*. 3(1):89-111.
- Rosales-Torres AM., Alonso I., Vergara M., M. C. Romano, H. Castillo-Juárez, A. Ávalos, A. Rosado, C.G. Gutiérrez. 2010. Vascular Endothelial Growth Factor isoforms 120, 164 and 205 are reduced with atresia in ovarian follicles of sheep. *Animal Reproduction Science* 122 (1-2): 111–117.
- Rosales-Torres AM., Guzmán AS., Aguilar CG. 2012. Follicular development in domestic ruminants. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*.15 (1).
- Rosales-Torres AM., Avalos-Rodríguez A., Vergar MO., Hernández-Pérez O., Ballesteros LM., García-Macedo R., Ortiz-Navarrete V., Rosado A. 2000. multiparametric study of atresia in ewe antral follicles: histology, flow cytometry, internucleosomal DNA fragmentation, and lysosomal enzyme activities in granulosa cells and follicular fluid. *Molecular Reproduction and Development*. 55 (3): 270-81.
- Roskoski R. 2008. VEGF receptor protein–tyrosine kinases: Structure and regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 375: 287-291.
- Ross MH., Pawlina W. 2016. *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*. Seventh edition. Philadelphia: Wolters Kluwer Health.
- Saito T., Takeda N., Amiya E., Nakao T., Abe H., Semba H., Soma K., Koyama K., Hosoya Y., Imai Y., Isagawa T., Watanabe M., Manabe I., Komuro I., Nagai R.,

- Maemura K., 2013. VEGF-A induces its negative regulator, soluble form of VEGFR-1, by modulating its alternative splicing. *FEBS Lett.* 587:2179–2185.
- Salustri A., Campagnolo L., Gioia FK., Camaioni A. 2019. Molecular organization and mechanical properties of the hyaluronan matrix surrounding the mammalian oocyte. *Matrix Biology.* 78-79: 11–23.
- Schaal TD., Maniatis T., 1999. Selection and characterization of pre-mRNA splicing enhancers: identification of Novel SR protein-specific enhancer sequences. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1705–1719.
- Schams D., Berisha B., Kosmann M., Amselgruber WM. 2002. Expression and localization of IGF family members in bovine antral follicles during final growth and in luteal tissue during different stages of estrous cycle and pregnancy. *Domestic Animal Endocrinology.* 22 (1): 51-72.
- Shimizu T., Jayawardana B.C., Nishimoto H., Kaneko E., Tetsuka M., Miyamoto, A., 2006. Hormonal regulation and differential expression of neuropilin (NRP)-1 and NRP-2 genes in bovine granulosa cells. *Reproduction.*131: 555-559.
- Shimizu T., Iijima K., Miyabayashi K., Ogawa Y., Miyazaki H., Sasada H., Sato E. 2007. Effect of direct ovarian injection of Vascular Endothelial Growth Factor gene fragments on follicular development in immature female rats. *Reproduction.* 134 (5): 677-682.
- Shiratsuki S., Hara T., Munakata Y., Shirasuna K., Kuwayama T., Iwata H. 2016. Low oxygen level increases proliferation and metabolic changes in bovine granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 437: 75-85.
- Stamm S., Ben-Ari S., Rafalska I., Tang Y., Zhang Z., Toiber D., Thanaraj TA., Soreq H., 2005. Function of alternative splicing. *Gene.* 344: 1-20.
- Stevens M. Oltean, S. 2019. Modulation of receptor tyrosine kinase activity through alternative splicing of ligands and receptors in the VEGFA/VEGFR Axis. *Cells.* 8: 288.

- Stewart M., Talks K., Leek R., Turley H., Pezzella F., Harris A., Gatter K. 2002. Expression of angiogenic factors and hypoxia inducible factors HIF-1, HIF-2 and CA IX in non-hodgkin's lymphoma. *Histopathology*. 40(3): 253-260.
- Stouffer RL., Martínez-Chequer JC., Molskness TA., Xu F., Hazzard TM. 2001. Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. *Archives of Medical Research*. 32(6): 567-575.
- Stuttfield E., Ballmer-Hofer K., 2009. Structure and function of VEGF receptors. *IUBMB Life* 61, 915–922.
- Su Y., Sugiura K., Eppig J. 2009. Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism. *Seminars in Reproductive Medicine*. 27(01): 32-42.
- Takahashi H., Shibuya M. 2005. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 109: 227–241.
- Taylor PD., Wilson H., Hillier SG., Wiegand SJ., Fraser HM. 2007. Effects of inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor at time of selection on follicular angiogenesis, expansion, development and atresia in the marmoset. *Molecular Human Reproduction*. 13(10): 729-736.
- Thompson JG., Brown HM., Kind KL., Russell DL. 2015. The ovarian antral follicle: living on the edge of hypoxia or Not1. *Biology of Reproduction*. 92(6).
- Tricarico C., Pinzani P., Bianchi S., Paglierani M., Distante V., Pazzagli M., Bustin SA., Orlando C. 2002. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to RRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Analytical Biochemistry*. 309(2): 293-300.
- Tsuzuki T., Okada H., Cho H., Tsuji S., Nishigaki A., Yasuda K., Kanzaki H. 2012. Hypoxic stress simultaneously stimulates Vascular Endothelial Growth Factor

via Hypoxia-Inducible Factor-1 and inhibits stromal cell derived factor-1 in human endometrial Stromal Cells. *Human Reproduction* 27(2): 523-530.

Twyffels L., Gueydan, C., Krays V. 2011. Shuttling SR proteins: more than splicing factors: Shuttling SR proteins. *FEBS J.* 278: 3246-3255.

Ulyatt C., Walker J., Ponnambalam S. 2011. Hypoxia differentially regulates VEGFR1 and VEGFR2 levels and alters intracellular signaling and cell migration in endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404: 774-779.

Vailhé B., Vittet D., Feige JJ., 2001. In Vitro models of vasculogenesis and angiogenesis. *Lab. Invest.* 81: 439-452.

Van der Feltz C., Anthony K., Brilot A., Pomeranz DA. 2012. Architecture of the spliceosome. *Biochemistry.* 51: 3321-3333.

VanKlombenberg MK., Manjarín R., Donovan C.E., Trott J.F., Hovey, R.C. 2016. Regulation and localization of vascular endothelial growth factor within the mammary glands during the transition from late gestation to lactation. *Domest. Anim. Endocrinol.* 54: 37-47.

Vásquez-Cano JF. 2010. Señalización celular en el folículo antral bovino. *Orinoquia.* 14(2): 1-9.

Waltenberger J., Claesson-Welsh L., Siegbahn A., Shibuya M., Heldin C. 1994. Different signal transduction properties of KDR and Flt1 two receptors for Vascular Endothelial Growth Factor. *J. Biol. Chem.* 269(43):29988-26995

Walter LM., Rogers PAW., Girling JE. 2010. Differential expression of Vascular Endothelial Growth Factor isoforms in the mouse uterus during early pregnancy. *Reproductive BioMedicine Online.* 21(6): 803-811.

Webb R., Nicholas B., Gong JG., Campbell BK., Gutiérrez CG., Garverick HA., Armstrong DG. 2003. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reproduction.* 61: 71-90.

- Wu FTH., Stefanini MO., Gabhann FM., Kontos CD., Annex BH., Popel AS., 2009. A systems biology perspective on sVEGFR1: its biological function, pathogenic role & therapeutic use. *J. Cell. Mol. Med.*
- Wu Q., Chang Y., Zhang L., Zhang Y., Tian T., Feng G., Zhou S., Zheng Q., Han F., Huang F. 2013. SRPK1 Dissimilarly Impacts on the Growth, Metastasis, Chemosensitivity and Angiogenesis of Glioma in Normoxic and Hypoxic Conditions. *J. Cancer.* 4: 727-735.
- Yakes F.M., Chinratanalab W., Ritter CA., King W., Seelig S., Arteaga CL. 2002. Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt Is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action. *J. Cancer.*62:4132-4141
- Yang MY., Fortune JE. 2007. Vascular Endothelial Growth Factor stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development.* 74(9): 1095-1104.
- Zeebaree B. K., W. Y. Kwong, G. E. Mann, C. G. Gutierrez, K. D. Sinclair. 2018. Physiological responses of cultured bovine granulosa cells to elevated temperatures under low and high oxygen in the presence of different concentrations of melatonin. *Theriogenology* 105: 107-14.
- Zhang H., K. Liu. 2015. Cellular and molecular regulation of the activation of mammalian primordial follicles: somatic cells initiate follicle activation in adulthood. *Human Reproduction Update.* 21 (6): 779-786.
- Zhang Z. D. Yin, Z. Wang. 2011. Contribution of Hypoxia-Inducible Factor-1 α to transcriptional regulation of vascular Endothelial Growth Factor in bovine developing luteal cells: HIF-1 α and transcriptional regulation of VEGF. *Animal Science Journal* 82(2): 244-50.
- Zamora-Gutiérrez D., Guzmán A., Hernández-Coronado C.G., Castillo-Juárez H., Fierro F., Gutiérrez C.G., Bojalil R., Rosales-Torres, AM. 2019. Co-ordinated expression of the VEGF system components in granulosa cells to

develop a proangiogenic autocrine milieu during ovarian follicle development. *Mol. Reprod. Dev.* 86:156-165.