

Acceso abierto

Artículo Original

Citación

Alcaraz M. Factor de crecimiento endotelial vascular durante la foliculogénesis en el ovario humano. Revista científica INSPILIP V. (2), Número 2, Guayaquil, Ecuador.

Factor de crecimiento endotelial vascular durante la foliculogénesis en el ovario humano

Vascular endothelial growth factor during folliculogenesis in the human ovary

Correspondencia

Eduardo Reyna
sippenbauch@gmail.com

- A) Docente. Magíster Scientiarum en Biología. Doctora en Biología Celular.
- B) Especialista en Ginecología y Obstetricia. Doctor en Ciencias Médicas.
- C) Docente. Doctora en Medicina Clínica.
- D) Docente. Doctora en Ciencias Médicas.

- 1) Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. Maracaibo. Venezuela.
- 2) Servicio de Obstetricia y Ginecología-Maternidad Dr. Nerio Beloso. Hospital Central Dr. Urquinaona. Maracaibo, estado Zulia. Venezuela.

Artículo recibido: 16/04/2018

Artículo aprobado: 26/12/2018

Artículo publicado: 27/12/2018

Resumen

El objetivo de la investigación fue establecer el modelo de expresión de factor de crecimiento endotelial (VEGF) durante la foliculogénesis en el ovario humano. La investigación fue aprobada por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia. Se recogieron muestras de tejido ovárico de mujeres en edad reproductiva sometidas a cirugía ginecológica por enfermedad benigna. Las células de la granulosa luteinizada y el líquido folicular se obtuvieron de mujeres sometidas a la recuperación de oocitos para la fertilización in vitro. Utilizando inmunohistoquímica, se localizó el VEGF en las células de la granulosa y la teca de los folículos antrales y en las células luteínicas del cuerpo lúteo. También se identificó en el líquido folicular humano. El VEGF y el ARN mensajero se identificaron por inmunohistoquímica en la granulosa luteinizada del ovario. La hibridación in situ demostró la expresión del ARN mensajero del VEGF en las células de luteína del cuerpo lúteo. Se concluye que las células de la granulosa y la teca de los folículos antrales y las células de luteína del cuerpo lúteo son fuentes de VEGF en el ovario humano.

El autor declara estar libre de cualquier asociación personal o comercial que pueda suponer un conflicto de intereses en conexión con el artículo, así como el haber respetado los principios éticos de investigación, como por ejemplo haber solicitado permiso para publicar imágenes de la o las personas que aparecen en el reporte. Por ello la revista no se responsabiliza por cualquier afectación a terceros.

Su expresión es paralela al patrón de la angiogénesis ovárica y su presencia en el líquido folicular humano sugiere un posible papel en la formación de este.

Palabras clave: Factor de crecimiento endotelial; ovario; foliculogénesis; angiogénesis.

Summary

The objective of the research was to establish the expression model of endothelial growth factor during folliculogenesis in the human ovary. The research was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine of La University of Zulia. Ovarian tissue samples were collected from women of reproductive age who underwent gynecological surgery for benign disease. Luteinized granulosa cells and follicular fluid were obtained from women undergoing oocyte recovery for in vitro fertilization. Using immunohistochemistry, VEGF was

localized in the granulosa and theca cells of the antral follicles and in the luteal cells of the corpus luteum. It was also identified in the human follicular fluid. VEGF and messenger RNA were identified by immunohistochemistry in the luteinized granulosa of the ovary. In situ hybridization demonstrated the expression of VEGF messenger RNA in the lutein cells of the corpus luteum. It is concluded that the granulosa and theca cells of the antral follicles and the lutein cells of the corpus luteum are sources of VEGF in the human ovary. Its expression is parallel to the pattern of ovarian angiogenesis and its presence in the human follicular fluid suggests a possible role in the formation of it.

Keywords: Endothelial growth factor; ovary; folliculogenesis; angiogenesis.

Introducción

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es una glicoproteína

homodimérica con un peso molecular de 45 kilodaltons ⁽¹⁾. También es un mitógeno altamente específico de las células endoteliales vasculares ⁽²⁾. Se han aislado varios tipos de clones de ADN que codifican el VEGF humano. Estas formas múltiples resultan del corte y empalme alternativo del ARN mensajero transcrito de un solo gen ⁽³⁾. Estas variantes contienen 121, 145, 165, 189 y 206 aminoácidos respectivamente (VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆). La transcripción del gen VEGF que codifica la variante de 165 aminoácidos es la más abundante. Las dos variantes más largas están principalmente asociadas a células, mientras que las formas más cortas corresponden a proteínas secretadas ⁽⁴⁾.

El VEGF actúa directamente sobre los receptores de tirosina-quinasa específicos codificados por los genes *flt* y *KDR/flk-1* (5,6). Las células diana de VEGF son las células endoteliales vasculares. El ARN mensajero del VEGF está ampliamente

distribuido en la gran mayoría de los tejidos, incluido cerebro, glándulas suprarrenales, corazón, células del músculo liso de la aorta, pulmones, riñones y ovarios. También es producido por una variedad de células malignas y parece desempeñar un papel importante en la angiogénesis tumoral ^(7,8).

El crecimiento folicular y el desarrollo del cuerpo lúteo se acompañan de la formación de una compleja red de vasos sanguíneos capilares ^(9,10). Estudios en animales han demostrado la presencia de ARN mensajero del VEGF en células de la granulosa y cuerpo lúteo en ovarios de roedores ^(11,12), bovinos ⁽¹³⁾ y primates ⁽¹⁴⁾. En el ovario humano, las células de la granulosa luteinizada expresan ARN mensajero del VEGF. Además, se ha demostrado que varias líneas celulares ováricas normales y neoplásicas también lo expresan ⁽¹⁶⁾. Mediante estudios de inmunohistoquímica, se ha demostrado la presencia del VEGF inmunorreactivo células de la granulosa y la teca durante la

fase folicular tardía y en las células luteínicas del cuerpo lúteo ^(10, 17). Este ARN mensajero también se ha demostrado que está presente en el cuerpo lúteo humano mediante hibridación in situ ⁽¹⁸⁾.

El propósito de la investigación fue establecer el modelo de expresión de factor de crecimiento endotelial durante la foliculogénesis en el ovario humano.

Materiales y métodos

La investigación fue aprobada por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia. Las secciones de tejido ovárico humano impregnadas en parafina se obtuvieron del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Central Dr. Urquinaona, Maracaibo, Venezuela. Además, se recogieron muestras de tejido ovárico de mujeres en edad reproductiva sometidas a cirugía ginecológica por enfermedad benigna. Las mujeres con patología ovárica fueron excluidas.

Las muestras fueron clasificadas de

acuerdo con la fecha del último período menstrual. También se obtuvieron células de granulosa luteinizada y fluido folicular de mujeres sometidas a recuperación de oocitos para fertilización in vitro. El protocolo de estimulación consistió en regulación negativa con 1 mg por día de acetato de leuprolide, seguido de 150 - 225 UI por día de hormona foliculoestimulante desde los días 2 - 5 más 150 - 225 IU por día de gonadotropina menopáusica humana desde el día 2 hasta el día de la inyección de gonadotropina coriónica humana. La ovulación se indujo con 10.000 UI de gonadotropina coriónica humana. La aspiración transvaginal se realizó 36 horas después de la inyección de gonadotropina coriónica humana.

Todas las muestras de tejido ovárico humano que se utilizaron para la extracción de proteínas y ARN se congelaron rápidamente en isopentano en hielo seco antes de almacenarse a -70° C.

Para realizar los estudios de

inmunohistoquímica e hibridación in situ, las muestras de tejido ovárico se congelaron instantáneamente a temperatura de corte óptimo y se sometieron a criosección a 8° C usando un micrótopo de congelación y posteriormente se colocaron en portaobjetos recubiertos. Todas las secciones se secaron expuestas al ambiente y se almacenaron a -70° C con desecante hasta su evaluación.

Se recolectó líquido folicular de mujeres sometidas a recuperación de oocitos para fertilización in vitro. Las células de la granulosa luteinizada se aislaron por centrifugación de fluido folicular a 200 g por cinco minutos ⁽¹⁵⁾. Los sedimentos celulares se lavaron por duplicado con medio de cultivo para agregarlos a la parte superior de cinco mililitros de Percoll al 55 por ciento y se centrifugaron a 1.200 g por 10 minutos. Luego las células de la granulosa se aspiraron y lavaron dos veces para eliminar Percoll para luego sembrarlas en cámaras de cultivo en

medio McCoy enriquecido con L-glutamina (0,3 g/L), penicilina (100,000 U/L), estreptomicina (100 mg/L), transferrina humana (10picog/mL) e insulina bovina (5 picog/mL). Las células se cultivaron durante 48 horas a 37° C en una incubadora humidificada con 5 % de CO₂.

Para realizar la inmunohistoquímica, las secciones ováricas congeladas se fijaron durante 20 minutos en formalina neutra al 10 % y se procesaron para la tinción inmunocitoquímica usando el sistema de peroxidasa. Las secciones se lavaron dos veces con fosfato salino, pH 7,4, y se trataron con 0,1 % de Triton X-100 en fosfato salino durante diez minutos a temperatura ambiente. Para bloquear la peroxidasa endógena, las secciones se trataron con peróxido de hidrógeno al tres por ciento en metanol durante diez minutos a temperatura ambiente. Todas las secciones de tejido incluidas en parafina se trataron con xileno usando tres cambios durante diez minutos cada una, y se

hidrataron gradualmente a través de alcoholes graduados. Posteriormente, las secciones se trataron con tripsina, se lavaron extensivamente con fosfato salino y se procesaron para inmunocitoquímica usando tinción con inmunoperoxidasa. Los sitios de unión no específicos se saturaron mediante secciones de incubación durante 30 minutos en fosfato salino que contenía 10 % de suero de cabra. Las secciones fueron incubadas luego durante una hora a temperatura ambiente con un anticuerpo policlonal monoespecífico contra VEGF humano a una dilución final de 1:1.000 en fosfato salino. Después las secciones se incubaron sucesivamente durante 30 minutos con IgG de conejo a una dilución final de 1:500 en fosfato salino. A continuación, las secciones se lavaron e incubaron durante 45 minutos con complejo macromolecular de avidina / biotinilado en fosfato salino. El VEGF inmunorreactivo se identificó mediante sustrato de 3,3'-diaminobenzidina peroxidasa. Las secciones se tiñeron con

hematoxilina, deshidrataron, aclararon con xileno y montaron permanentemente. Los experimentos de control negativo se realizaron incubando secciones con suero de conejo normal en lugar del anticuerpo primario.

En el análisis de Northern Blot se utilizó el ARN total de las células de la granulosa luteinizada se extrajo con reactivo RNA Stat-GO. Se desnaturalizaron 10, 15 y 20 microgramos de ARN calentando muestras hasta 60° C durante 15 minutos en ácido 3-N-morfolinpropanosulfónico, con 6 % de formaldehído y 50 % por ciento de formamida y se agregó a gel de agarosa al 1 % que contenía 0,66 M de formaldehído. Después de la electroforesis, el ARN fue transferido sobre una membrana nailon Nytran mediante electrotransferencia e inmovilizado por reticulación ultravioleta. Las transferencias se para prehibridación a 42° C durante cuatro horas en una solución con solución de Denhardt, 50 % de formamida, 0,1 % de diacetilsulfato de

sodio, 100 pg/mL de esperma de salmón desnaturalizado y 0,5 pg/ml de ARN de transferencia. Se detectó la transcripción del VEGF por una sonda de hibridación marcada. Las transferencias se hibridaron durante la noche a 42° C en una solución de prehibridación que contenía 106 cpm/mL de la sonda marcada. Después de la hibridación, se eliminó el isótopo libre lavando las transferencias dos veces en fosfato salino estándar con ácido etilendiaminotetraacético, 0,1 por ciento de diacetilsulfato sódico a temperatura ambiente durante 15 minutos, dos veces en fosfato salino estándar con ácido etilendiaminotetraacético, otra vez con 0,1 % diacetilsulfato sódico a 37° C durante 15 minutos y nuevamente con fosfato salino estándar con ácido etilendiaminotetraacético y 0,1 % de diacetilsulfato sódico a 60° C por 30 minutos. La autorradiografía se realizó a -70° C con pantallas intensificadoras. El tamaño del ARN mensajero se determinó mediante el uso de marcador de escala de

ARN estándar en un carril contiguo.

Durante la evaluación con Western Blot, los restos celulares se eliminaron del fluido folicular mediante centrifugación a 16.000 g por 15 minutos a 4° C. La proteína en el sobrenadante se cuantificó usando el método de ensayo de proteína Coomassie. Se fraccionó una cantidad igual (100 picog) de la proteína en gel de poliacrilamida- diacetilsulfato sódico al 10 % en condiciones reductoras y se transfirió a una membrana de polímero de polivinildenediflorida mediante electrotransferencia. Los sitios de unión no específicos se saturaron incubando membranas durante una hora en el reactivo de bloqueo preparado en solución salina amortiguadora Tris con Tween-20. Las membranas se expusieron después a una dilución 1:1000 de anticuerpo policlonal anti-VEGF de conejo en fosfato salino que contenía 0,1 % de albúmina de suero bovino purificada durante una hora a temperatura ambiente. Después de varios lavados con la solución salina

amortiguadora Tris con Tween-20, las membranas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en una solución que contenía una IgG marcada con peroxidasa en una dilución final de 1:1500. Las proteínas inmunorreactivas se visualizaron utilizando quimioluminiscencia mejorada. La masa molecular de las proteínas se determinó corriendo la proteína marcadora de masa molecular estándar en un carril contiguo. Para la hibridación in situ, las secciones ováricas congeladas se descongelaron y se fijaron en paraformaldehído al 4 % y fosfato salino durante diez minutos a temperatura ambiente. Después de tres lavados con fosfato salino, las secciones se trataron con 0,1 % de Triton X-100 durante diez minutos a temperatura ambiente. Para bloquear las cargas positivas en los tejidos, las secciones se acetilaron durante diez minutos en anhídrido acético al 0,25 % en 0,1 M de trietanolamina a pH 8,0. Las secciones se enjuagaron luego en citrato de sodio salino

de doble concentración, se deshidrataron en soluciones de concentración de etanol ascendentes y se secaron al vacío con desecante. La hibridación se realizó incubando las secciones en una cámara humidificada durante 18 horas a 42° C en solución de hibridación que contenía 50 % de formamida, 0.3 M de cloruro de sodio, 10 mM de Tris (pH 8.0), 1 mM de ácido etilendiaminotetraacético, 0,1 % de citrato de sodio salino, solución de Denhardt, 200 picog de ARN de transferencia, 200 picog/mL de ADN desnaturalizado de esperma de salmón, 10 mM de ditioneitol, 10 % (peso/volumen) de sulfato de dextran y 1×10^6 cpm/mL sonda de hibridación marcada de ARN de VEGF. Los experimentos de control negativo se realizaron por hibridación de secciones con la sonda de ARN de VEGF marcada. La sonda de hibridación de VEGF se unió a un vector que contenía un sitio promotor T7 y SPG y luego se transformó en células competentes JM 109. El vector se extrajo, purificó y localizó utilizando enzimas de

restricción específicas. Ambas sondas de hibridación de ARN se transcribieron a partir de moldes de ADN alineados usando un kit de transcripción. El isótopo no incorporado se eliminó por cromatografía en columnas Sephadex G-50. Después de la hibridación, las secciones se lavaron cuatro veces durante cinco minutos cada una cuatro veces con citrato de sodio salino y se trataron durante 30 minutos a 37° C con 50 picog/mL de ARNasa A en 0,5 M de cloruro de sodio, 10 mM de Tris (pH 8,0) y 1 mM de ácido etilendiaminotetraacético. Los portaobjetos se lavaron dos veces con citrato de sodio salino durante cinco minutos cada vez a temperatura ambiente, una vez en citrato de sodio salino durante diez minutos a temperatura ambiente, una vez en 0,5 x citrato de sodio salino durante diez minutos a temperatura ambiente y luego una vez con citrato de sodio salino durante 30 minutos a 60° C. Los portaobjetos se deshidrataron, se secaron

al aire, se sumergieron en la emulsión Kodak NTB-2 y se expusieron durante 10 días a 4° C. Se extendieron las muestras sobre portaobjetos y posteriormente se tiñeron ligeramente con hematoxilina y se montaron permanentemente.

Resultados

Las células de la granulosa de folículo atrésico no mostraron inmunotinción para VEGF (Figura 1A). Los folículos ováricos preantrales tampoco se tiñeron para VEGF (figura 1B). Los folículos de Graaf exhibieron inmunotinción intensa para VEGF en las células de los cúmulos de la granulosa (figura 2A). Por otra parte, los folículos antrales mostraron inmunotinción positiva tanto en las capas de células de la teca como de la granulosa (figura 2B). En el cuerpo lúteo, tanto las células luteínicas grandes como pequeñas se presentaron inmunotinción positiva para VEGF (figura 2C).

Las células de la granulosa luteinizada obtenidas de mujeres sometidas a fertilización in vitro se tiñeron

intensamente para VEGF (figura 3). El análisis de transferencia usando ARN extraído de células de granulosa humanas cultivadas reveló la presencia de ARNm de VEGF a 3,9 KB.

Cuando se examinó un cuerpo lúteo mediante hibridación in situ, las células de luteína se hibridaron fuertemente con una sonda para VEGF (figura 4A). No se detectó hibridación significativa con la sonda de detección correspondiente (figura 4B).

El análisis para VEGF en fluido folicular humano obtenido de pacientes sometidos a fertilización in vitro reveló dos bandas a 23 KD correspondientes a la proteína VEGF en todas las muestras analizadas.

Discusión

La angiogénesis es la generación de vasos sanguíneos capilares nuevos. Ocurre como un proceso subyacente fundamental en varias condiciones fisiológicas y patológicas. En el sistema reproductivo femenino la angiogénesis

ocurre como un evento normal tanto en ovario como en útero. La foliculogénesis ovárica cíclica y la formación del cuerpo lúteo están acompañadas por el desarrollo de una compleja red de capilares ^(10,11).

Mientras que los folículos preantrales no tienen un suministro vascular propio, poco después que se desarrolla el antro, el folículo adquiere una red vascular desde la teca. Después de la ruptura folicular, los vasos tecales extienden una red rica de microvasos que invade y proporciona nutrientes al cuerpo lúteo en desarrollo. Estos cambios en el patrón vascular sugieren la liberación local de factores angiogénicos. Los nuevos capilares son altamente permeables, lo que permite el transporte de moléculas grandes como la lipoproteína de baja densidad. Estas moléculas son esenciales para el suministro de grandes cantidades de colesterol necesarias para la esteroidogénesis durante la fase lútea y el embarazo temprano.

El folículo seleccionado para la ovulación

posee una microvasculatura más extensa que otros folículos, lo que mejora la administración de gonadotropinas, como lo demuestra la presencia de gonadotropina coriónica radiomarcada al foliculo en maduración ⁽²⁰⁾. Las células de la granulosa y la teca de los folículos ováricos son fuentes de actividad angiogénica, que parece estar bajo el control de las gonadotropinas ⁽²¹⁾. Estudios previos han establecido la importancia del VEGF en la angiogénesis del cuerpo lúteo. El tratamiento de ratas con receptores solubles de Flt-1 truncados, que inhiben la bioactividad del VEGF, produce supresión completa de la angiogénesis y la función del cuerpo lúteo ⁽²²⁾. Los hallazgos de esta investigación amplían los hallazgos de estudios previos que confirman que la expresión de VEGF es paralela al desarrollo vascular durante la foliculogénesis y la formación del cuerpo lúteo. Se debe destacar que las células del cúmulo de la granulosa parecen mostrar inmunotinción más intensa que las células

de la granulosa mural o las de la teca. La importancia de este hallazgo no está clara.

El mecanismo de la formación de líquido folicular es poco conocido. Los hallazgos de esta investigación confirman los resultados de estudios previos que demuestran la presencia del VEGF en el líquido folicular humano obtenido en la aspiración transvaginal de mujeres sometidas a fertilización in vitro (23-25).

Se ha propuesto que la secreción local del VEGF por las células de la granulosa hace que los microvasos tecales sean más permeables, llevando al aumento de la extravasación de plasma y, por lo tanto, provoca acumulación de líquido antral en los folículos en maduración.

El síndrome de hiperestimulación ovárica es una complicación rara, pero grave de la fertilización in vitro. No obstante, su mecanismo fisiopatológico del síndrome todavía no se comprende completamente. Las características distintivas son aumento del volumen del ovario y acumulación aguda de fluido hacia un tercer

componente. Este cambio en la acumulación de líquidos es secundario a mayor permeabilidad capilar y se considera que puede estar mediada por alguna sustancia de origen ovárico. Se han propuesto varios elementos como posibles mediadores, incluyendo prostaglandinas, histamina, serotonina, prolactina y renina ⁽²⁶⁾. Sin embargo, no existe suficiente evidencia para señalar a alguna de estas sustancias como factor etiológico.

Se han demostrado altas concentraciones de VEGF en líquido ascítico de pacientes con síndrome de hiperestimulación ovárica ⁽²⁷⁾ y varios estudios han demostrado concentraciones elevadas de VEGF en el suero y el líquido folicular de mujeres con síndrome de hiperestimulación ovárica ⁽²⁸⁻³⁰⁾. Tanto el líquido folicular como peritoneal de pacientes con alta respuesta a hiperestimulación ovárica controlada muestran aumento significativo en la tasa de permeabilidad a través de células endoteliales in vitro ⁽³¹⁾. Estudios in vitro

demonstraron la capacidad de los anticuerpos anti-VEGF para revertir la permeabilidad de las células endoteliales de líquido folicular obtenido de pacientes con síndrome de hiperestimulación ovárica ⁽³²⁾. Los ovarios de mujeres con síndrome de ovarios poliquísticos muestran una fuerte inmunotinción para VEGF en células estromales ⁽¹⁸⁾. Las pacientes con síndrome de ovarios poliquísticos tienen niveles séricos elevados de VEGF, así como aumento en el flujo sanguíneo ovárico ^(29,33).

Los factores que regulan la expresión del ARN mensajero del VEGF no se conocen completamente. Sin embargo, se ha demostrado que la hipoxia regula positivamente la síntesis del VEGF ⁽³⁴⁾. La expresión de ARN mensajero por células granulosas luteinizadas humanas se potencia en presencia la gonadotropina coriónica humana ⁽³⁵⁾. Tanto el estradiol como el acetato de medroxiprogesterona potencian la expresión de ARN mensajero

del VEGF en células endometriales cultivadas ⁽³⁶⁾. La gonadotropina coriónica humana, hormona foliculoestimulante recombinante y prostaglandina-E2 estimulan la expresión de ARN mensajero del VEGF en células granulosas luteinizadas ⁽³⁷⁾. Estos factores, junto con el patrón de expresión de VEGF, asocian en forma significativa a las gonadotropinas como las principales reguladoras del ciclo ovárico.

parte de la fisiopatología de la anovulación crónica, así como la degeneración o atresia folicular.

Conclusión

Los datos de la investigación demuestran que las fuentes del VEGF en el ovario humano son las células de la granulosa y teca de los folículos antrales y las células luteinizadas del cuerpo lúteo. La expresión del ARN mensajero del VEGF es similar al patrón del desarrollo vascular durante la foliculogénesis y formación del cuerpo lúteo, demostrando que todo esto está regulado por hormonas. Por otra parte, la expresión aberrante del VEGF puede ser

Referencias

1. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. 1989. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;425:540-7.
2. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003;9:669-76.
3. Dehghanian F, Hojati Z, Kay M. New Insights into VEGF-A Alternative Splicing: Key Regulatory Switching in the Pathological Process. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2014;6:192-9.
4. Vernes JM, Meng YG. Detection and Quantification of VEGF Isoforms by ELISA. *Methods Mol Biol.* 2015;1332:25-37.
5. Pamukcu B, Shantsila E, Lip GY. Soluble fms-like tyrosine kinase-1 – a novel marker for atherosclerotic progression? –. *Circ J.* 2010;74:2064-5.
6. Zeng H, Zhao D, Yang S, Datta K, Mukhopadhyay D. Heterotrimeric G alpha q/G alpha 11 proteins function upstream of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 (KDR) phosphorylation in vascular permeability factor/VEGF signaling. *J Biol Chem.* 2003;278:20738-45.
7. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal-redux. *Cancer Immunol Res.* 2015;3:1-11.
8. Zerrouqi A, Van Meir EG. A conspiracy of glioma and endothelial cells to invade the normal brain. *Oncotarget.* 2011;2:1-4.
9. Kong HS, Lee J, Youm HW, Kim SK, Lee JR, Suh CS, Kim SH. Effect of treatment with angiopoietin-2 and vascular endothelial growth factor on the quality of xenografted bovine ovarian tissue in mice. *PLoS One.* 2017;12:e0184546.
10. Feng Y, Cui P, Lu X, Hsueh B, Möller Billig F, Zarnescu Yanez L, Tomer R, Boerboom D, Carmeliet P, Deisseroth K, Hsueh AJ. CLARITY reveals dynamics of ovarian follicular architecture and vasculature in three-dimensions. *Sci Rep.* 2017;7:44810.
11. Ali I, Chouhan VS, Dangi SS, Gupta M, Tandiya U, Hyder I, Yadav VP, Panda RP, Babitha V, Nagar V, Sonwane A, Khan FA, Das BC, Singh G, Bag S, Sarkar M. Expression and localization of locally produced growth factors regulating lymphangiogenesis during different stages of the estrous cycle in corpus luteum of buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology.* 2014;81:428-36.
12. Whittington CM, Danastas K, Grau GE, Murphy CR, Thompson MB. Expression of VEGF 111 and other VEGF-A variants in the rat uterus is correlated with stage of pregnancy. *J Comp Physiol B.* 2017;187:353-360.
13. Ji Y, Lu X, Zhong Q, Liu P, An Y, Zhang Y, Zhang S, Jia R, Tesfamariam IG, Kabsay AG, Zhang L, Zhu W, Zheng Y. Transcriptional profiling of mouse uterus at pre-implantation stage under VEGF repression. *PLoS*

One. 2013;8:e57287.

14. Kim SO, Trau HA, Duffy DM. Vascular endothelial growth factors C and D may promote angiogenesis in the primate ovulatory follicle. *Biol Reprod.* 2017;96:389-400.

15. Shah DK, Menon KM, Cabrera LM, Vahratian A, Kavoussi SK, Lebovic DI. Thiazolidinediones decrease vascular endothelial growth factor (VEGF) production by human luteinized granulosa cells in vitro. *Fertil Steril.* 2010;93:2042-7.

16. Tsukagoshi S, Saga Y, Suzuki N, Fujioka A, Nakagawa F, Fukushima M, Suzuki M. Thymidine phosphorylase-mediated angiogenesis regulated by thymidine phosphorylase inhibitor in human ovarian cancer cells in vivo. *Int J Oncol.* 2003;22:961-7.

17. Rohozinski J, Diaz-Arrastia C, Edwards CL. Do some epithelial ovarian cancers originate from a fallopian tube ciliate cell lineage? *Med Hypotheses.* 2017;107:16-21

18. Joseph C, Hunter MG, Sinclair KD, Robinson RS. The expression, regulation and function of secreted protein, acidic, cysteine-rich in the follicle-luteal transition. *Reproduction.* 2012;144:361-72.

19. Pauciullo P. Lipoprotein transport and metabolism: a brief update. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2002;12:90-7.

20. Filatov M, Khramova Y, Parshina E, Bagaeva T, Semenova M. Influence of gonadotropins on ovarian follicle growth and development in vivo and in vitro. *Zygote.* 2017;25:235-243.

21. Trau HA, Brännström M, Curry TE Jr, Duffy DM. Prostaglandin E2 and vascular endothelial growth factor A mediate angiogenesis of human ovarian follicular endothelial cells. *Hum Reprod.* 2016;31:436-44.

22. Woad KJ, Robinson RS. Luteal angiogenesis and its control. *Theriogenology.* 2016;86:221-8.

23. Bishop CV, Lee DM, Slayden OD, Li X. Intravenous neutralization of vascular endothelial growth factor reduces vascular function/permeability of the ovary and prevents development of OHSS-like symptoms in rhesus monkeys. *J Ovarian Res.* 2017;10:41.

24. Xu Y, Hutchison SM, Hernández-Ledezma JJ, Bogan RL. Increased 27-hydroxycholesterol production during luteolysis may mediate the progressive decline in progesterone secretion. *Mol Hum Reprod.* 2018;24:2-13

25. Nishigaki A, Okada H, Okamoto R, Shimoi K, Miyashiro H, Yasuda K, Kanzaki H. The concentration of human follicular fluid stromal cell-derived factor-1 is correlated with luteinization in follicles. *Gynecol Endocrinol.* 2013;29:230-4.

26. Kwik M, Maxwell E. Pathophysiology, treatment and prevention of ovarian hyperstimulation syndrome.

Curr Opin Obstet Gynecol. 2016;28:236-41.

27. Şahin N, Apaydın N, Töz E, Sivrikoz ON, Genç M, Turan GA, Cengiz H, Eskicioğlu F. Comparison of the effects of letrozole and cabergoline on vascular permeability, ovarian diameter, ovarian tissue VEGF levels, and blood PEDF levels, in a rat model of ovarian hyperstimulation syndrome. Arch Gynecol Obstet. 2016;293:1101-6.

28. Ghasemi N, Dehghani Firouzabadi R, Ahmadi S. Association of -460C/T and +405 G/C polymorphisms of vascular endothelial growth factor gene and susceptibility to ovarian hyperstimulation syndrome. Int J Reprod Biomed (Yazd). 2017;15:87-92.

29. Wang TH, Horng SG, Chang CL, Wu HM, Tsai YJ, Wang HS, Soong YK. Human chorionic gonadotropin-induced ovarian hyperstimulation syndrome is associated with up-regulation of vascular endothelial growth factor. J Clin Endocrinol Metab. 2002;87:3300-8.

30. Jakimiuk AJ, Nowicka MA, Zagozda M, Koziol K, Lewandowski P, Issat T. High levels of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1/sFlt1 and low levels of vascular endothelial growth factor in follicular fluid on the day of oocyte retrieval correlate with ovarian hyperstimulation syndrome regardless of the stimulation protocol. J Physiol Pharmacol. 2017;68:477-484

31. Scotti L, Di Pietro M, Pascuali N, Irusta G, I de Zúñiga, Gomez Peña M, Pomilio C, Saravia F, Tesone M, Abramovich D, Parborell F. Sphingosine-1-phosphate restores endothelial barrier integrity in ovarian hyperstimulation syndrome. Mol Hum Reprod. 2016;22:852-866.

32. Jakimiuk AJ, Nowicka MA, Zagozda M, Koziol K, Lewandowski P, Issat T. High levels of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1/sFlt1 and low levels of vascular endothelial growth factor in follicular fluid on the day of oocyte retrieval correlate with ovarian hyperstimulation syndrom regardless of the stimulation protocol. J Physiol Pharmacol. 2017;68:477-484.

33. Qu J, Che Y, Xu P, Xia Y, Wu X, Wang Y. The Higher Response of Vascular Endothelial Growth Factor and Angiotensin-II to Human Chorionic Gonadotropin in Women with Polycystic Ovary Syndrome. Int J Fertil Steril. 2015;8:373-8.

34. Mishra A. Angiogenic neovessels promote tissue hypoxia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113:10458-60.

35. Wang TH, Horng SG, Chang CL, Wu HM, Tsai YJ, Wang HS, Soong YK. Human chorionic gonadotropin-induced ovarian hyperstimulation syndrome is associated with up-regulation of vascular endothelial growth factor. J Clin Endocrinol Metab. 2002;87:3300-8.

36. Cao H, Wei YX, Zhou Q, Zhang Y, Guo XP, Zhang J. Inhibitory effect of curcumin in human

endometriosis endometrial cells via downregulation of vascular endothelial growth factor. *Mol Med Rep.* 2017;16:5611-5617.

37. Trau HA, Davis JS, Duffy DM. Angiogenesis in the primate ovulatory follicle is stimulated by luteinizing hormone via prostaglandin E2. *Biol Reprod.* 2015;92:15.

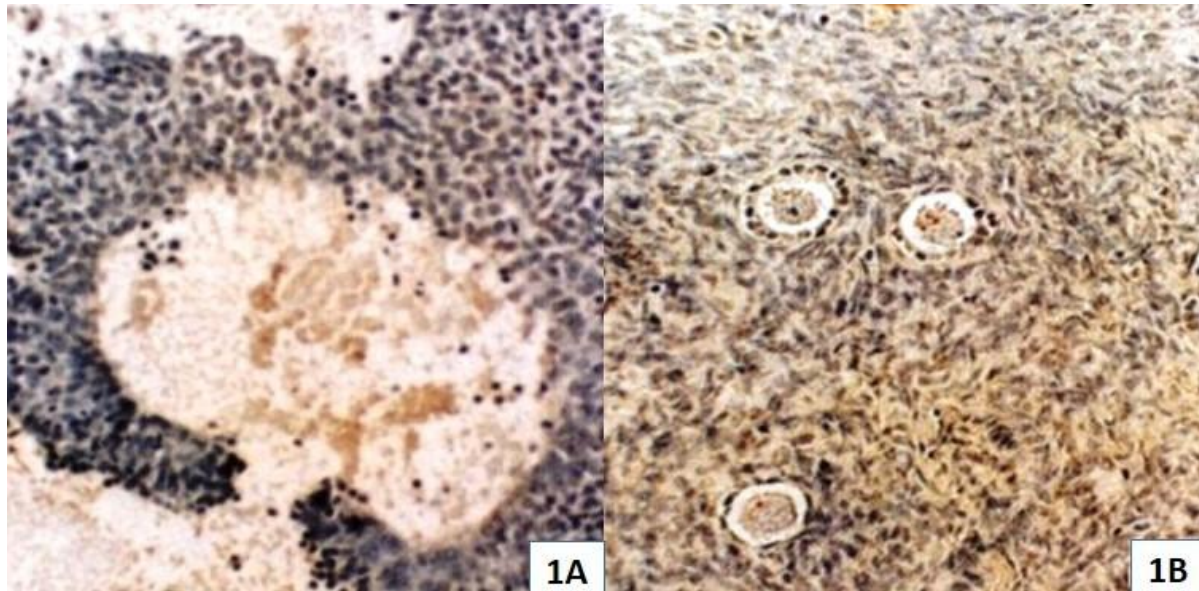


Figura 1. Ausencia de inmunotinción para VEGF en (A) células de la granulosa de folículo atrésico y (B) folículo preantral. Secciones de parafina coloreados con hematoxilina. 200X.

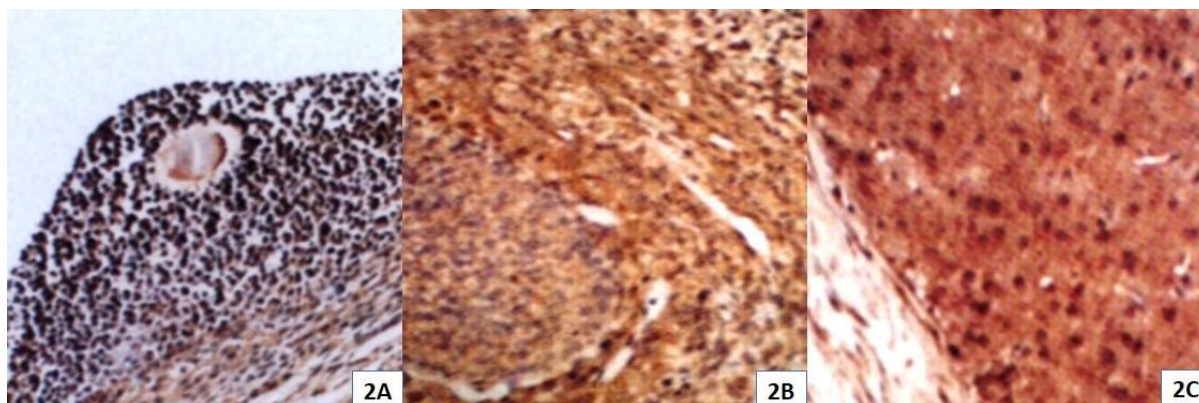


Figura 2. Inmunotinción para VEGF del folículo antral. (2A) Folículo de Graff, (2B) folículo antral y (2C) cuerpo lúteo. Secciones de parafina coloreados con hematoxilina. 200X.

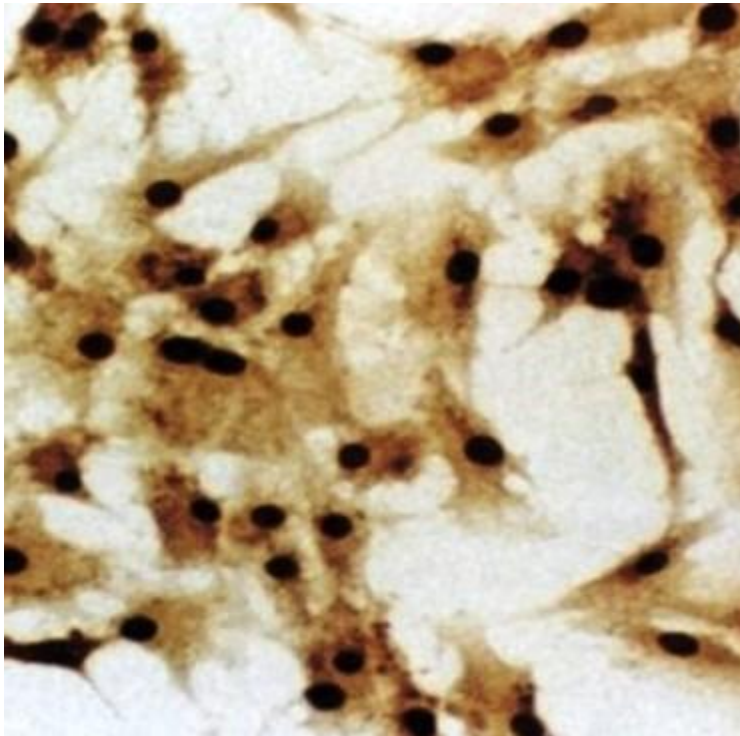


Figura 3. *Inmunotinción para VEGF de las células de la granulosa luteinizadas con anticuerpos para VEGF. Secciones de parafina coloreados con hematoxilina. 200X.*

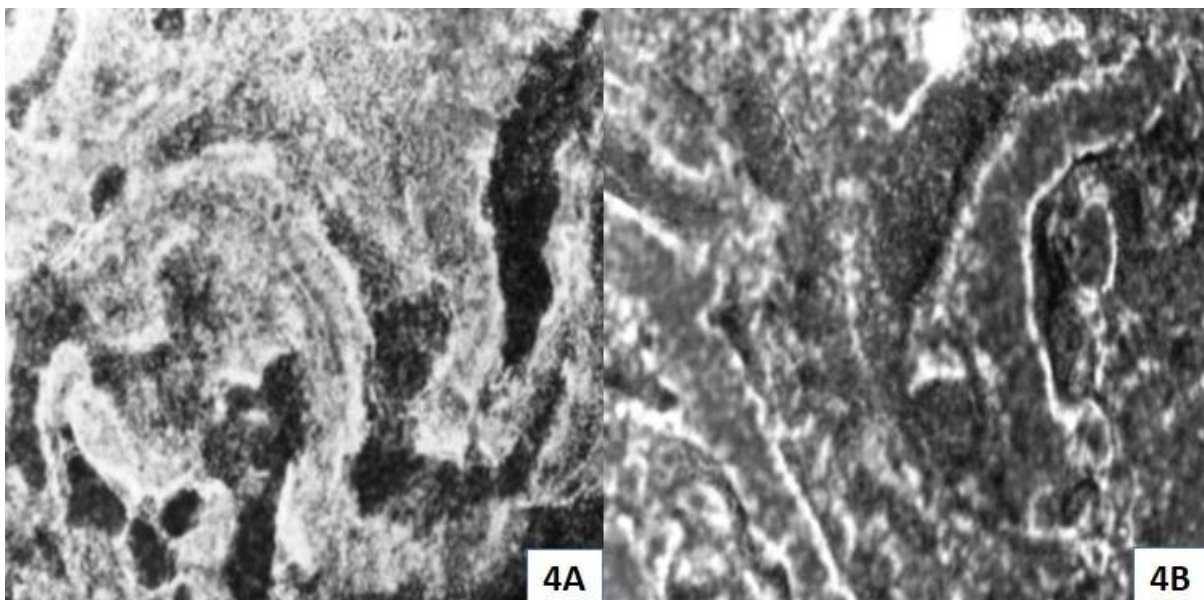


Figura 4. *Hibridación in situ del cuerpo lúteo. (4A) Las zonas negras de la sección por la sonda de prueba de VEGF. (4B) Las zonas oscuras, similar a la sección de la 4A, pero con hibridación con la sonda de control para VEGF.*