

Implicancias Fisiológicas y Patológicas de la Angiogénesis en el Ovario

Parborell Fernanda; Abramovich Dalbia; Tesone Marta

1. Angiogénesis Fisiológica en el Ovario

1.1. Vasculogénesis y angiogénesis

Los procesos mediante los cuales se forman los vasos sanguíneos pueden dividirse en dos: *vasculogénesis* y *angiogénesis*. La *vasculogénesis* ocurre durante el desarrollo embrionario y consiste en la diferenciación de células precursoras en células endoteliales. La *angiogénesis* consiste en la proliferación de estas células endoteliales jóvenes mediante al menos tres procesos: (1) ruptura de la membrana basal de los vasos sanguíneos preexistentes; (2) migración de las células endoteliales en respuesta a estímulos angiogénicos; (3) proliferación de las células endoteliales para estabilizar a los nuevos brotes vasculares. La formación de capilares a partir de redes vasculares preexistentes esta regulada por una variedad de factores que han sido identificados en los últimos 40 años. La mayor parte de ellos son factores de crecimiento no específicos para las células endoteliales, como por ejemplo, el factor de crecimiento fibroblástico básico (FGFb). El primer factor en ser caracterizado en base a su capacidad para promover la proliferación de las células endoteliales, así como para aumentar la permeabilidad vascular fue el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF). Pero existen otros factores proangiogénicos y una gran variedad de citoquinas que están activamente involucradas en este proceso ^[1].

En el adulto, la angiogénesis es infrecuente en condiciones fisiológicas y el endotelio de la mayoría de los tejidos es una población estable y de baja tasa mitótica ^[2]. Se observa angiogénesis principalmente en procesos de reparación de tejidos, como cicatrización de heridas y fracturas. Diversas patologías se asocian tanto a una excesiva tasa mitogénica de las células endoteliales (crecimiento tumoral, retinopatías, hemangiomas, artritis reumatoidea, fibrosis, etc.) ^[2,3], como a una disminución en la angiogénesis normal (retraso en cicatrización de heridas, úlceras varicosas crónicas, falta de cicatrización de fracturas) ^[3].

Los tejidos del sistema reproductor femenino adulto, incluyendo ovario, útero y placenta, presentan una alta tasa mitogénica sólo comparable al crecimiento tumoral ^[4]. Sin embargo, a diferencia de los procesos tumorales, el crecimiento de estos tejidos ocurre en

forma limitada y altamente ordenada. Esta alta tasa de crecimiento es sostenida por el rápido desarrollo de una red vascular de modo que los tejidos con mayor grado de desarrollo se caracterizan por estar altamente irrigados ^[4].

Debido a que el **ovario** es uno de los pocos órganos del adulto que presenta un alto grado de angiogénesis a intervalos regulares, se ha propuesto a dicho órgano como modelo para el estudio no sólo de la función reproductiva sino también de la angiogénesis en general.

1.2. Factores angiogénicos ováricos

En el adulto, la vasculatura ovárica es uno de los pocos órganos donde ocurre el desarrollo, mantenimiento y regresión de vasos sanguíneos. La adquisición de un adecuado aporte vascular es probablemente un paso limitante en la selección y maduración del folículo dominante destinado a ovular. Los folículos preantrales no poseen vasculatura propia. Sin embargo, a medida que el antro se desarrolla, el tejido tecal adquiere vasculatura en forma de dos redes capilares: una en la teca externa y otra en la teca interna. El desarrollo y crecimiento de estos capilares probablemente están controlados por factores angiogénicos producidos por células de granulosa ^[5]. Estos podrían actuar en distintos momentos, algunos estimulando el crecimiento y otros mediando la reorganización de células endoteliales en estructuras vasculares más complejas.

La maduración del folículo preovulatorio requiere el desarrollo de una vasculatura suficiente para el aporte de colesterol unido a lipoproteínas ^[6]. La degeneración de los capilares causa la atresia folicular, lo cual ocurre normalmente en el ovario con aquellos folículos que fallan en su desarrollo. En bovinos se ha demostrado que, durante este proceso, ocurre apoptosis en los capilares tecales ^[7]. En la ovulación, los elementos vasculares emergen del tejido tecal luego de la ruptura folicular e invaden la capa avascular de células de la granulosa, estableciéndose una red capilar que nutrirá el cuerpo lúteo en desarrollo. En forma inversa, la integridad de la vasculatura luteal declina durante la luteólisis al final del ciclo femenino. Este impresionante ciclo de neovascularización, estabilización y degeneración vascular ocurre en respuesta a factores angiogénicos locales producidos por las células de granulosa o luteales ^[1,8-10]. Entre éstos, en los últimos años han

tomado especial importancia: FGFb, VEGF y las angiopoietinas (ANPT).

1.2.1. FGFb

El FGFb fue el primer factor angiogénico identificado en el ovario. Se encuentra expresado tanto en el folículo maduro como en el cuerpo lúteo, con pequeñas variaciones durante el ciclo ovárico. Estimula la proliferación de células endoteliales y ejerce un efecto antiapoptótico en las células de la granulosa. Por lo tanto, favorece la producción de otros factores angiogénicos y más aún, inhibe la producción de óxido nítrico (NO) ^[1].

El FGFb, además de estar involucrado en la angiogénesis luteal, participa en otros aspectos de las funciones luteales. Por ejemplo, se ha demostrado que los FGFs inhiben la muerte celular en varios tipos celulares. Además, mientras que el tejido luteal remanente es reabsorbido durante la regresión luteal, los microvasos luteales más largos se mantienen alejados de la muerte celular a la vez que presentan un aumento en los receptores de FGF. Por lo tanto, se sugiere que el FGF puede afectar no sólo la producción de las células luteales sino también el funcionamiento de las células luteales y el mantenimiento vascular ^[11].

1.2.2. VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular)

Tanto el folículo ovárico como el cuerpo lúteo producen diversos factores angiogénicos. Entre ellos se encuentran los miembros de la familia de los factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF) los cuales incluyen al VEGF y al factor de crecimiento placentario

(PlGF). Los mismos fueron identificados basándose en la secuencia homóloga de estas proteínas. Dentro de la familia de VEGF se distinguen VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD, VEGFE y VEGFF. La primera molécula identificada fue el VEGFA, por lo que originalmente el término de VEGF se refería a esta integrante. Además, cinco isoformas moleculares para VEGFA se producen en el humano como resultado de splicing alternativo del transcripto primario, de las cuales las tres isoformas más pequeñas son solubles (VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅ y VEGF₁₆₅) y las dos más largas (VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆) se encuentran generalmente unidas a membrana. VEGF cumple su rol fisiológico a través de casi exclusivamente tres receptores pertenecientes a la familia de tirosin kinasas llamados VEGFR1 (Flt-1), VEGFR2 (KDR/Flk-1) y VEGFR3 (Flt-4) ^[12]. El ARNm del receptor Flt-1 puede generar la forma completa del receptor o una forma soluble, sFlt-1, que carece del extremo c-terminal. Además, actualmente hay varios estudios que demuestran que el VEGFA se une selectivamente a dos neurofilinas, NP1 (VEGF₁₆₅) y NP2 (VEGF₁₆₅ y VEGF₁₄₅) las cuales son receptores de membrana de tipo 1 ^[12] (Figura 1).

Existe gran evidencia de que VEGFA no es sólo un potente factor angiogénico ovárico ^[1], sino también un factor de supervivencia para las células endoteliales en ciertos tipos de microvasos ^[12]. Se conoce también que participa en el mantenimiento estructural de los vasos sanguíneos ya formados y aumenta la permeabilidad capilar ^[13]. El rol de los otros miembros de la familia de VEGF es poco claro. VEGFB participaría en el crecimiento coronario y en la vascularización en ratones.

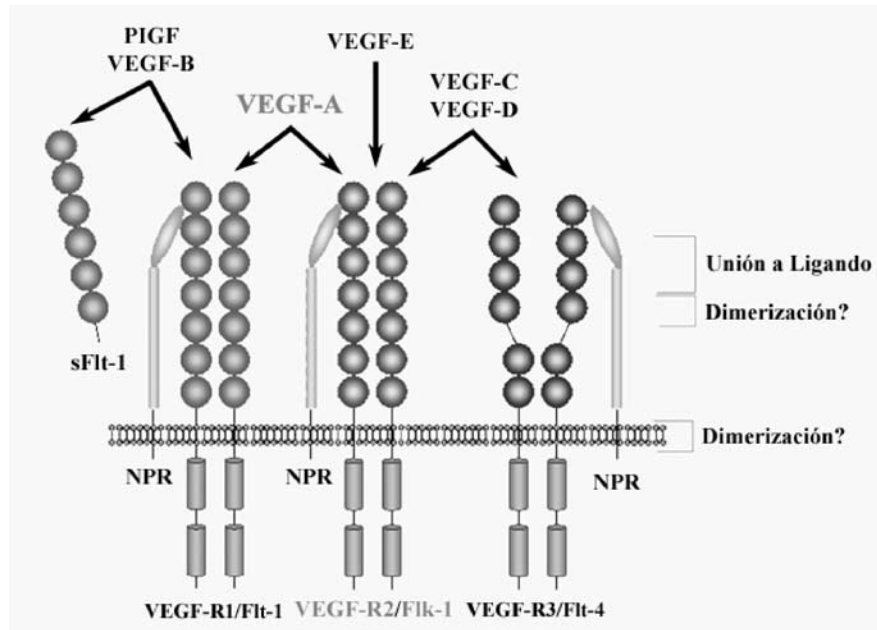


Figura 1. Receptores y ligandos de VEGF (Adaptado del Instituto Paul Scherrer, área Molecular Cell Biology, Suiza). NPR = Neurofilina.

VEGFC parece importante para el desarrollo linfático. Poco se conoce actualmente sobre VEGFD, VEGFE (un homólogo viral de VEGF) o VEGFF.

Se propuso inicialmente que VEGFR1 y VEGFR2 mediarían diferentes actividades del VEGFA. El sistema de VEGFR1 sería importante en la interacción célula-célula en células endoteliales y en la formación de vasos. En contraste, el sistema VEGFR2 estaría presente en la formación, migración y proliferación de las células endoteliales.

Todas las isoformas para VEGFA han sido detectadas en el ovario [12]. Se ha reportado la existencia de VEGFA en células de la granulosa y en células de la teca a nivel de ARNm [14]. La expresión de VEGFA depende del tamaño folicular. En folículos bovinos y porcinos VEGFA se expresa débilmente durante el desarrollo folicular temprano mientras que dicha expresión aumenta durante el desarrollo del folículo dominante [15,16]. En ovario de rata se han encontrado resultados similares [17]. Stouffer y col. (2001) mostraron en ovario de primate que tanto el ARNm como la proteína de VEGF se encuentran ausentes en las células de la granulosa de folículos primordiales y preantrales, pero se vuelven evidentes en las células de la teca de folículos antrales y en las células de la granulosa cercanas al ovocito en el folículo preovulatorio [12]. Durante el intervalo periovulatorio los niveles de VEGFA en el fluido folicular aumentan marcadamente. Además se observó una alta expresión de VEGFA en la zona pelúcida [18]. Típicamente, VEGFD se expresa sólo en músculo en altas concentraciones, aunque también se observa cierta expresión en ovario. Tanto VEGFR1 como VEGFR2 se expresan en ovario y recientemente se han observado neurofilinas en tejido ovárico de roedores y primates [12].

Varios trabajos han estudiado el rol que cumple VEGF en la función ovárica mediante el uso de anticuerpos neutralizantes anti VEGF [19], anticuerpos anti receptor 2 de VEGF (VEGFR2) [20], inhibidores de tirosin kinasas del VEGFR2 [21] y antagonistas basados en la estructura del receptor (VEGF Traps) [22,23].

Wulff y colaboradores (2002) demostraron que en monas tratadas con VEGF Trap durante la fase folicular, los folículos preantrales y antrales tempranos eran normales pero carecían de folículos antrales grandes característicos de la fase folicular tardía [23]. Por otro lado, monas Rhesus en las que se inyectó Trap directamente dentro del folículo preovulatorio, presentaron fallas en la ovulación y, aquellas que sí ovularon, exhibieron una disminución en la secreción de progesterona con una fase lútea de duración normal [24].

Zimmermann y colaboradores (2002) evaluaron el efecto de la administración sistémica de un anticuerpo anti VEGFR2 a monas con el objetivo de examinar el resul-

tado de la inhibición de VEGF en la fase folicular temprana y media. Se observó un retraso en el pico de estradiol de la fase folicular y una disminución en la secreción de inhibina B; acompañados por un aumento de LH y FSH séricas [20].

Fraser y colaboradores (2005) administraron VEGF Trap a monas en la fase folicular media, observando un retraso en la ovulación debido posiblemente a una falla en la selección del folículo dominante [25].

La administración de un anticuerpo anti VEGF en forma sistémica en monas durante la fase folicular tardía, produjo un aumento en la duración de la fase folicular con un retraso en la ovulación y en el pico de estradiol característico de esta fase [19]. En ratón, la administración exógena de gonadotrofinas a animales hipofisectomizados estimuló el desarrollo folicular en los animales control, mientras que no tuvo efecto sobre aquéllos que recibieron además un anticuerpo para bloquear el receptor 2 de VEGF [22].

Por otro lado, Quintana y colaboradores (2004) muestran que la administración directa de VEGF en el ovario de ratón causa un mayor desarrollo vascular, promoviendo el desarrollo folicular y la apoptosis ovárica [26].

Trabajos recientes realizados en nuestro laboratorio indican que la inhibición local de VEGF causa un aumento en el número de folículos atrésicos y una disminución en el número de folículos periovulatorios. Esto se debe a un aumento en la apoptosis de las células foliculares mediado por un desbalance en los niveles de las proteínas de la familia de BCL2. Estos resultados, junto con los obtenidos por Quintana y colaboradores, sugieren que el VEGF podría actuar como un factor de supervivencia para las células foliculares ováricas [27].

1.2.3. ANPT (angiopoietinas)

Mientras que el VEGFA es el principal iniciador de la angiogénesis, la formación y diferenciación de una red vascular madura y funcional requiere de la acción coordinada de varios factores. Hasta ahora, tres ANPT diferentes han sido aisladas en ratón (ANPT 1, ANPT 2 y ANPT 3) y una en humano (ANPT 4). Las ANPT se unen a un mismo receptor tipo tirosin kinasa denominado Tie 2. Un receptor similar, Tie 1, ha sido también identificado en células endoteliales pero aún se desconoce su ligando (figura 2). La importancia de Tie 2 reside en que parece esencial para la reclusión de las células estromales que rodean a los vasos para estabilizar la estructura vascular y modular su función. Además se ha demostrado que este sistema participa en el intercambio de fluido capilar y en la resistencia al estrés hemodinámico. Mientras que ANPT 1 se une específicamente y activa a Tie 2, ANPT 2 se une también con alta especificidad a Tie 2 pero es incapaz de activarlo. Por lo

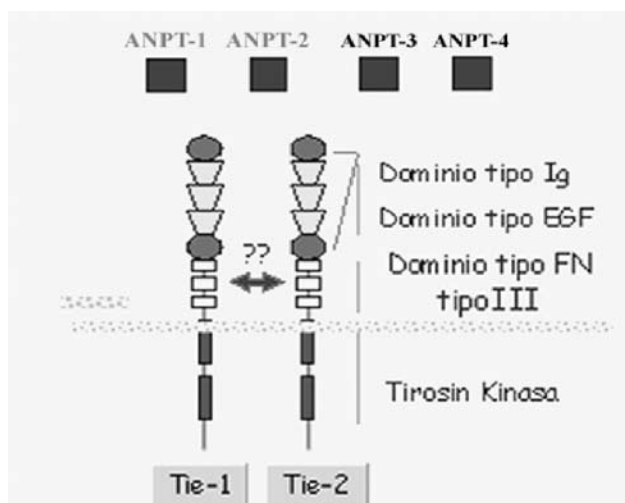


Figura 2. Receptores y ligandos de ANPT.

Ig = Inmunoglobulina; EGF = Factor de Crecimiento Endotelial; FN = Fibronectina.

tanto, ANPT 2 es un antagonista natural de ANPT 1 en las células endoteliales, aunque no se haya observado lo mismo en otros tipos celulares ^[17].

A diferencia de VEGF, las ANPT no son mitógenos de células endoteliales pero, sin embargo, son críticas para la angiogénesis y la integridad vascular ^[12]. En el humano, los genes de las ANPT 1 y ANPT 2 se encuentran localizados en el cromosoma 8 y codifican a glicoproteínas de 498 y 496 aminoácidos, respectivamente ^[17,28]. Yancopoulos y col demostraron que la alteración de los genes de ANPT 1 o de Tie 2 o la sobreexpresión de ANPT 2 provocan la muerte de los embriones por existir una angiogénesis anormal. Por lo tanto, estos resultados muestran que las ANPT cumplirían un rol esencial durante el desarrollo temprano ^[29].

También, en nuestro laboratorio, se ha demostrado que en ratas prepúberes hiperestimuladas, la inhibición de ANPT1 mediante un Ac neutralizante causa una disminución en el número de folículos preovulatorios y un aumento en el número de folículos atresicos. Esto se debe a un aumento en la apoptosis de células foliculares dada por un desbalance en los niveles de proteínas pro y anti apoptóticas de la familia de BCL 2 ^[30].

La ANPT 1 se expresa en una amplia variedad de tejidos, mientras que la ANPT 2 se expresa en el tracto reproductor femenino (placenta, útero y ovario) bajo condiciones fisiológicas ^[17].

También, han sido descritas otras ANPT como la ANPT 3, que ha sido identificada en ratón y actuaría como un agonista del receptor Tie 2, mientras que la ANPT 4 ha sido identificada en humanos y actuaría como antagonista natural del receptor ^[31].

Contrariamente al VEGA A, la ANPT 1 es incapaz de estimular la proliferación de células endoteliales ^[28] pero

es indispensable en el reclutamiento de células peri-vasculares lo que permite la maduración y estabilización de los vasos recién formados ^[17,32]. La ANPT 2 es un antagonista natural de la ANPT 1 y promueve el mantenimiento de un estado menos estable del endotelio capilar, lo que permite la migración de células endoteliales y la neovascularización ^[17]. Por lo tanto, se cree que la ANPT 2 en presencia de VEGA A, podría promover la ramificación de los vasos mediante el bloqueo de la señal de ANPT 1 mientras que, en ausencia de VEGA A, la inhibición de la señal de ANPT 1 producida por ANPT 2 induciría la regresión de los vasos ^[29,33]. Podría decirse, por lo tanto, que en las células endoteliales se expresan uno o varios componentes requeridos por ANPT 2 para actuar como antagonista de ANPT 1.

1.3. Factores antiangiogénicos

1.3.1. Angiostatina

La angiostatina es un inhibidor circulatorio de la angiogénesis de 38 KDa que puede ser generada desde el plasminógeno circulante (el cual no es angiostático por sí mismo) o por reducción de la plasmina por varias proteasas, incluyendo algunas metaloproteasas de matriz ^[34]. Por lo tanto, las metaloproteasas de matriz pueden tener efectos opuestos en la angiogénesis. Por un lado, facilitan el brote de nuevos vasos por degradación de la matriz extracelular perivascular pero, por otro, contribuyen en la liberación de angiostatina, un potente inhibidor de la angiogénesis. Fue purificada originalmente de la orina y del suero de un modelo de ratón para carcinoma de células pulmonares de Lewis ^[35]. Se ha visto que la angiostatina ejerce un rol crítico en la angiogénesis luteal ya que la administración exógena de este factor en folículos preovulatorios de primate altera el desarrollo y la función del cuerpo lúteo en forma dosis dependiente ^[24].

1.3.2. Endostatina

La endostatina es otro ejemplo de un inhibidor de la angiogénesis que es derivado de un precursor no angiostático por clivaje enzimático. Se ha demostrado que tanto la cathepsina L como la elastasa pueden generar la endostatina a partir del colágeno XVIII ^[35]. Durante el desarrollo de nuevos vasos, las células endoteliales liberan enzimas proteolíticas como la cathepsina L, la cual podría ahora clivar al colágeno XVIII y liberar los fragmentos de endostatina. Estos fragmentos, a su vez, actuarían como inhibidores locales de la angiogénesis. Por lo tanto, el procesamiento de colágeno XVIII a endostatina podría representar un mecanismo local de control para la regulación de la angiogénesis ^[36].

Además, la endostatina reduce la angiogénesis inducida por FGFb y VEGF, y disminuye el VEGF en las células tumorales.

1.3.3. Trombospondinas

Las trombospondinas (TSP) TSP-1 y TSP-2 son glicoproteínas de la matriz extracelular similares en estructura pero diferentes en su localización y sus niveles de expresión. Tanto la TSP 1 como la TSP 2 se unen a la superficie del receptor CD36 inhibiendo la angiogénesis e induciendo la apoptosis de las células endoteliales.

La expresión folicular de TSPs disminuye durante la maduración del folículo, a la vez que aumentan los niveles de VEGF. En la etapa luteal temprana, la expresión de los mensajeros para TSP 1 y TSP 2 aumentan conjuntamente. Como en este período el proceso de vascularización es muy activo, las trombospondinas podrían prevenir un excesivo desarrollo vascular o estimular el desarrollo de las células luteales.

2. ANGIOGÉNESIS PATOLÓGICA EN EL TRACTO REPRODUCTOR FEMENINO

Los defectos en la angiogénesis en el tracto reproductor femenino pueden contribuir a una variedad de desórdenes como la anovulación e infertilidad, la pérdida de embarazo, el síndrome de hiperestimulación ovárica (OHSS), la poliquistosis ovárica (PCOS) y neoplasmas ováricos.

2.1. Síndrome de Hiperestimulación Ovárica

El OHSS es una complicación iatrogénica severa del crecimiento y maduración folicular ocasionada por la inducción de la ovulación en tratamientos de fertilización asistida, en los cuales se administran análogos de GnRH y altas dosis de gonadotrofinas.

Aunque la prevalencia de OHSS es baja (0,3-5% de ciclos de estimulación), es importante destacar que el OHSS es una complicación causada por protocolos de estimulación ovárica con gonadotrofinas que, en algunos casos, puede tener resultados fatales. Los factores de riesgo que han sido implicados en el desarrollo de OHSS son múltiples, como por ejemplo mujeres que poseen un elevado número de receptores para gonadotrofinas o con síndrome de ovario poliquístico. Las características de la enfermedad involucran: aumento en el tamaño del ovario, sobreproducción de hormonas esteroideas y sustancias como citoquinas, angiotensina y VEGF, contribuyendo de esta manera al aumento de permeabilidad vascular y formación de quistes. Además, estos quistes son de tejido luteal y hemorrágicos. El VEGF es el principal candidato involucrado en la patogénesis de OHSS [37-39]. Se ha observado que los niveles séricos de VEGF aumentan luego de la administración de gonadotrofina coriónica humana (hCG) en mujeres hiperestimuladas con riesgo a desarrollar OHSS [40]. Además, que las concentraciones de VEGF en suero, fluido peritoneal y folicular en pacientes con riesgo a OHSS se encuentran

correlacionadas positivamente con el desarrollo del síndrome [41]. Varios autores han mostrado que el VEGF en pacientes OHSS proviene de un ovario hiperestimulado debido a que la concentración de VEGF en fluido folicular es 100 veces mayor comparada a la del suero [41,42]. Hasta ahora se sabe muy poco sobre la patofisiología y el tratamiento de OHSS.

2.2. Poliquistosis Ovárica

El PCOS en humanos es un desorden endocrinológico y metabólico común pero muy complejo, de etiología desconocida. Afecta a mujeres en edad reproductiva y su frecuencia oscila entre el 5 y 10%. Se caracteriza por una menstruación irregular, hirsutismo, anovulación e infertilidad, entre otros.

Las manifestaciones endocrinológicas de PCOS incluyen una producción excesiva de andrógenos de origen ovárico y/o adrenal, y un desarrollo folicular arrestado que lleva a una oligo o anovulación crónica. Además, como consecuencia de la folículogénesis aberrante, se observa acumulación de pequeños quistes foliculares y un aumento del ancho estromático del ovario, los cuales producen una morfología característica (corona radiada) en el estudio por ultrasonido. Entre las manifestaciones de PCOS se incluye una vascularidad folicular y una permeabilidad vascular aumentada, así como niveles elevados de VEGF en suero y en folículos. Se observa, además, ausencia de folículo dominante e hiperplasia de células de la teca y del estroma, que pueden representar manifestaciones de varios mecanismos patogénicos en los ovarios poliquísticos.

2.3. Cáncer ovárico

La angiogénesis es esencial para el crecimiento de la mayor parte de los tumores primarios y sus metástasis. Tanto la angiogénesis fisiológica como la tumoral se encuentran reguladas en su microambiente por una serie de factores de crecimiento del huésped. Algunos de estos, como el VEGF, son altamente específicos para las células endoteliales, mientras que otros, como el FGFb, poseen un campo de acción mucho más extenso. Los factores de activación pueden ser producidos por los mismos tumores, por el tejido circundante o por infiltración de macrófagos y fibroblastos.

El cáncer de ovario se caracteriza por la diseminación intraperitoneal de carcinomatosis y formación de grandes volúmenes de líquido ascítico. VEGF puede jugar un rol principal en la progresión del cáncer de ovario, al promover la angiogénesis tumoral y la producción de ascitis mediante la estimulación de la permeabilidad vascular. Varios estudios han indicado que la angiogénesis regulada por VEGF es un componente importante del crecimiento del cáncer de ovario [43]. En un modelo murino

de cáncer de ovario se utilizó una droga (SU6668) que inhibe la angiogénesis al inhibir la acción de FGFb y de VEGF. Se observó una inhibición en la progresión del carcinoma ovárico en la cavidad peritoneal ^[44]. En el carcinoma de ovario se ha observado un aumento de la densidad vascular que se correlaciona con un aumento en la incidencia de metástasis, así como una disminución en los porcentajes de supervivencia del paciente. Además, los niveles de FGFb y VEGF se encuentran elevados en los fluidos corporales (suero, orina, etc.) en los pacientes con cáncer de ovario ^[11].

3. Consideraciones finales

Los factores angiogénicos se expresan en forma cíclica en el ovario durante toda la edad reproductiva en la mujer. La síntesis de los mismos es regulada entre otros factores por gonadotropinas, y su secreción precisa es crítica para la correcta función ovárica. La producción en forma patológica de VEGF o angiopoietinas es responsable de muchas de las enfermedades reproductivas, tales como PCOS, pérdida temprana del embarazo, OHSS, endometriosis y neoplasmas benignos o malignos. Por lo tanto, la comprensión de la fisiología de estos factores y la manera en la que participan en la patogenia de las diversas enfermedades, es fundamental para generar nuevos tratamientos para las mismas, o para desarrollar nuevas estrategias para el control de la fertilidad femenina.

4. Referencias

- [1] Tamanini C, De Ambrogi M. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reprod Domest Anim* 2004;39:206-16
- [2] Klagsbrun M, D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996;7:259-70
- [3] Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987;235:442-7
- [4] Reynolds LP, Grazul-Bilska AT, Killilea SD, Redmer DA. Mitogenic factors of corpora lutea. *Prog. Growth Factor Res* 1994;5:159-75
- [5] Grasselli F, Tirelli M, Cavalli V, Bussolati S, Tamanini C. VEGF, bFGF and swine granulosa cells: proliferation, steroidogenesis and NO production. *Vet Res Commun* 2003;27 Suppl 1:233-5
- [6] Davis JS, Rueda BR, Spaniel-Borowski K. Microvascular endothelial cells of the corpus luteum. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:89
- [7] Jiang JY, Macchiarelli G, Tsang BK, Sato E. Capillary angiogenesis and degeneration in bovine ovarian antral follicles. *Reproduction* 2003;125:211-23
- [8] Hazzard TM, Christenson LK, Stouffer RL. Changes in expression of vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 and -2 in the macaque corpus luteum during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 2000;6:993-8
- [9] Geva E, Jaffe RB. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. *Fertil Steril* 2000;74:429-38
- [10] Tesone M, Borman SM, Hennebold JD, Stouffer RL. Differential Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF-A) Isoforms in the Monkey Corpus Luteum During the Menstrual Cycle. T Abstract 2003 SSR Annual Meeting, Cincinnati, Ohio, EE.UU. 2003
- [11] Reynolds LP, Grazul-Bilska AT, Redmer DA. Angiogenesis in the female reproductive organs: pathological implications. *Int J Exp Pathol* 2002;83:151-63
- [12] Stouffer RL, Martinez-Chequer JC, Molskness TA, Xu F, Hazzard TM. Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. *Arch Med Res* 2001;32:567-75
- [13] Redmer DA, Doraiswamy V, Bortnem BJ, Fisher K, Jablonka-Shariff A, Grazul-Bilska AT, Reynolds LP. Evidence for a role of capillary pericytes in vascular growth of the developing ovine corpus luteum. *Biol Reprod* 2001;65:879-89
- [14] Shweiki D, Itin A, Neufeld G, Gitay-Goren H, Keshet E. Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. *J Clin Invest* 1993;91:2235-43
- [15] Barboni B, Turriani M, Galeati G, Spinaci M, Bacci ML, Forni M, Mattioli M. Vascular endothelial growth factor production in growing pig antral follicles. *Biol Reprod* 2000;63:858-64
- [16] Greenaway J, Connor K, Pedersen HG, Coomber BL, LaMarre J, Petrik J. Vascular endothelial growth factor and its receptor, Flk-1/KDR, are cytoprotective in the extravascular compartment of the ovarian follicle. *Endocrinology* 2004;145:2896-905
- [17] Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997;277:55-60
- [18] Celik-Ozenci C, Akkoyunlu G, Kayisli UA, Arici A, Demir R. Localization of vascular endothelial growth factor in the zona pellucida of developing ovarian follicles in the rat: a possible role in destiny of follicles. *Histochem Cell Biol* 2003;120:383-90
- [19] Zimmermann RC, Xiao E, Husami N, Sauer MV, Lobo R, Kitajewski J, Ferin M. Short-term administration of antivascular endothelial growth factor antibody in the late follicular phase delays follicular development in the rhesus monkey. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:768-72

- [20] Zimmermann RC, Xiao E, Bohlen P, Ferin M. Administration of antivascular endothelial growth factor receptor 2 antibody in the early follicular phase delays follicular selection and development in the rhesus monkey. *Endocrinology* 2002;143:2496-502
- [21] Gomez R, Simon C, Remohi J, Pellicer A. Vascular endothelial growth factor receptor-2 activation induces vascular permeability in hyperstimulated rats, and this effect is prevented by receptor blockade. *Endocrinology* 2002;143:4339-48
- [22] Zimmermann RC, Hartman T, Kavic S, Pauli SA, Bohlen P, Sauer MV, Kitajewski J. Vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis is essential for gonadotropin-dependent follicle development. *J Clin Invest* 2003;112:659-69
- [23] Wulff C, Wilson H, Wiegand SJ, Rudge JS, Fraser HM. Prevention of thecal angiogenesis, antral follicular growth, and ovulation in the primate by treatment with vascular endothelial growth factor Trap R1R2. *Endocrinology* 2002;143:2797-807
- [24] Hazzard TM, Xu F, Stouffer RL. Injection of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 into the preovulatory follicle disrupts ovulation and subsequent luteal function in rhesus monkeys. *Biol Reprod* 2002;67:1305-12
- [25] Fraser HM, Wilson H, Morris KD, Swanston I, Wiegand SJ. Vascular endothelial growth factor Trap suppresses ovarian function at all stages of the luteal phase in the macaque. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:5811-8
- [26] Quintana R, Kopkow L, Sueldo C, Marconi G, Rueda NG, Baranao RI. Direct injection of vascular endothelial growth factor into the ovary of mice promotes follicular development. *Fertil Steril* 2004;82 Suppl 3:1101-5
- [27] Abramovich D, Parborell F, Tesone M. Effect of a vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibitory treatment on the folliculogenesis and ovarian apoptosis in gonadotropin-treated prepubertal rats. *Biol Reprod* 2006;75:434-41
- [28] Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 1996;87:1161-9
- [29] Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000;407:242-8
- [30] Parborell F, Abramovich D, Tesone M. Intrabursal Administration of the Antiangiopoietin 1 Antibody Produces a delay in Rat Follicular Development Associated with increase in ovarian apoptosis mediated by changes in the expression of BCL2 related genes. *Biol Reprod* 2007 en prensa.
- [31] Valenzuela DM, Griffiths JA, Rojas J, Aldrich TH, Jones PF, Zhou H, McClain J, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Huang T, Papadopoulos N, Maisonpierre PC, Davis S, Yancopoulos GD. Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:1904-9
- [32] Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996;87:1171-80
- [33] Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 1997;277:48-50
- [34] Chavakis E, Dimmeler S. Regulation of endothelial cell survival and apoptosis during angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:887-93
- [35] Distler JH, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, Gay RE, Gay S, Distler O. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med* 2003;47:149-61
- [36] Zatterstrom UK, Felbor U, Fukai N, Olsen BR. Collagen XVIII/endostatin structure and functional role in angiogenesis. *Cell Struct Funct* 2000;25:97-101
- [37] McClure N, Healy DL, Rogers PA, Sullivan J, Beaton L, Haning RV, Jr., Connolly DT, Robertson DM. Vascular endothelial growth factor as capillary permeability agent in ovarian hyperstimulation syndrome. *Lancet* 1994;344:235-6
- [38] Abramov Y, Barak V, Nisman B, Schenker JG. Vascular endothelial growth factor plasma levels correlate to the clinical picture in severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 1997;67:261-5
- [39] McElhinney B, Ardill J, Caldwell C, McClure N. Preventing ovarian hyperstimulation syndrome by inhibiting the effects of vascular endothelial growth factor. *J Reprod Med* 2003;48:243-6
- [40] Pellicer A, Albert C, Mercader A, Bonilla-Musoles F, Remohi J, Simon C. The pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome: in vivo studies investigating the role of interleukin-1beta, interleukin-6, and vascular endothelial growth factor. *Fertil Steril* 1999;71:482-9
- [41] Agrawal R, Tan SL, Wild S, Sladkevicius P, Engmann L, Payne N, Bekir J, Campbell S, Conway G, Jacobs H. Serum vascular endothelial growth factor concentrations in in vitro fertilization cycles predict the risk of ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 1999;71:287-93
- [42] Artini PG, Monti M, Fasciani A, Tartaglia ML, D'Ambrogio G, Genazzani AR. Correlation between the amount of follicle-stimulating hormone administered and plasma and follicular fluid vascular endothelial growth factor concentrations in women undergoing in vitro fertilization. *Gynecol Endocrinol* 1998;12:243-7

[43] Mesiano S, Ferrara N, Jaffe RB. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer: inhibition of ascites formation by immunoneutralization. *Am J Pathol* 1998;153:1249-56

[44] Garofalo A, Naumova E, Manenti L, Ghilardi C, Ghisleni G, Caniatti M, Colombo T, Cherrington JM,

Scanziani E, Nicoletti MI, Giavazzi R. The combination of the tyrosine kinase receptor inhibitor SU6668 with paclitaxel affects ascites formation and tumor spread in ovarian carcinoma xenografts growing orthotopically. *Clin Cancer Res* 2003;9:3476-85