

Actualizaciones

Técnicas experimentales para el estudio de la angiogénesis en enfermedades reproductivas femeninas

Experimental techniques for the study of angiogenesis in female reproductive diseases

Lic. Scotti, Leopoldina*; Dra. Abramovich, Dalhia*; Dra. Irusta, Griselda*; Lic. Pazos, Camila*; Lic. Pascuali, Natalia*; Lic. Haro Durand, Luis*; Dr. de Zúñiga Ignacio E, Dra. Tesone, Marta** y Dra. Parborell, Fernanda*
e-mail: fparborell@gmail.com

*Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET, Buenos Aires, Argentina

& Centro Médico PREGNA Medicina Reproductiva

Facultad de Cs. Exactas y Naturales, UBA.

Resumen

El desarrollo vascular en el tracto reproductivo femenino es un proceso que se encuentra restringido a la formación del cuerpo lúteo y a la proliferación del endometrio uterino durante los ciclos menstruales. Se han identificado numerosos inductores de la angiogénesis, que incluyen, entre otros, los miembros del factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y la familia del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), angiopoyetinas (ANGPT), factor de crecimiento transformante (TGF) y factor derivado de plaquetas (PDGF). Los defectos en la angiogénesis ovárica contribuyen a una variedad de desórdenes, incluyendo anovulación e infertilidad, pérdida de embarazo, síndrome de hiperestimulación ovárica (SHEO), síndrome de ovario poliquístico (SOP) y neoplasmas ováricos. Es decir, el endotelio es una fuente y un blanco de sustancias vasoactivas que son secretadas debido a las condiciones que se desencadenan durante los desórdenes ya mencionados. Para evaluar los mecanismos bioquímicos y moleculares que participan en la angiogénesis, se han desarrollado métodos in vitro (migración por herida, tubulogénesis, etc.) e in vivo (implante de Matrigel, membrana corionalantoide, etc.). Los ensayos in vitro pueden ser útiles para validar los primeros pasos de la angiogénesis pero deben ser confirmados por estudios in vivo. En particular, los ensayos in vitro e in vivo descritos en este trabajo para evaluar el desarrollo de los vasos pueden ser aplicados para el estudio de desórdenes reproductivos con alteraciones en la angiogénesis (SHEO, SOP, cáncer de ovario, etc.) mediante la utilización del suero, líquido peritoneal, fluido folicular o de biopsias de distintos tejidos provenientes de las pacientes.

Palabras clave: angiogénesis, reproducción femenina, endotelio, pericitos.

Abstract

Vascular development is a process mainly limited to the female reproductive system during corpus luteum formation and proliferation of uterine endometrium in menstrual cycles. Numerous inducers of angiogenesis have been identified, including the members of the FGF-2 (Basic Fibroblast Growth Factor) and Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF) family, angiopoietins, transforming growth factors (TGF) and platelet-derived growth factor (PDGF).

Alterations of ovarian angiogenesis contribute to the pathophysiology of different ovarian conditions such as anovulation and infertility, Ovarian Hyperstimulation Syndrome (OHSS), Polycystic Ovary Syndrome (PCOS), pregnancy lost, uterine bleeding, subfertility, endometriosis and ovarian neoplasms. Because of the described reasons, in these pathologic situations, the endothelium would be a potential target due to be the source of vasoactive substances. For the evaluation of biochemical and molecular mechanisms involved in the angiogenesis process, in vitro (wound healing assay, tubular structures formation) and in vivo (Matrigel plug assay, chorioallantoid membrane assay) methodology has been developed. While in vitro assays are useful for the study of early angiogenesis, the observations must be confirmed with in vivo techniques. Particularly, in this review, both in vivo and in vitro assays described are those which are used for the comprehension of reproductive disorders with altered angiogenesis (OHSS, PCOS, ovarian cancer, etc.). These techniques are performed on patient's serum, peritoneal or follicular fluid or tissue biopsies.

Key words: angiogenesis, female reproduction, endothelium, pericitos.

Generalidades

La angiogénesis que ocurre en el adulto es el proceso por el cual se forman vasos sanguíneos nuevos

a partir de vasculatura preexistente (1). Esta vasculatura es modificada mediante el brote y crecimiento de nuevos vasos para formar finalmente patrones de vasos interconectados característicos de los vasos sanguíneos maduros. La vasculatura previamente formada debe primero desestabilizarse para permitir la formación de nuevos vasos sanguíneos que irrigen tejidos previamente avasculares. Luego, las células endoteliales proliferan y migran para formar estructuras tubulares inmaduras que terminan siendo redes vasculares interconectadas. Esta vasculatura nueva debe madurar para ser completamente funcional. Durante este proceso, las nuevas células endoteliales se integran y se unen fuertemente a células soporte, como pericitos y células musculares lisas, y a la matriz que rodea el vaso (2) (FIGURA 1).

El desarrollo vascular, en el tracto reproductivo femenino, es un proceso que se encuentra restringido a la formación del cuerpo lúteo y a la proliferación del endometrio uterino durante los ciclos menstruales. Se han identificado numerosos inductores de la angiogénesis (3). Estos incluyen, entre otros, los miembros del factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y la familia del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), angiopoyetinas (ANGPT), factor de crecimiento transformante (TGF) y el factor derivado de plaquetas (PDGF) (4).

Mientras que el VEGF es el principal iniciador de la angiogénesis, ya que estimula la proliferación de células endoteliales y aumenta la permeabilidad vascular, la formación y diferenciación de una red vascular madura y funcional requiere de la acción coordinada de varios factores. Entre estos se encuentran la angiopoyetina 1 y

2 (ANGPT-1 y ANGPT-2), que actúan a través de sus receptores tirosina-quinasa Tie1 y Tie2 (5). Contrariamente al VEGF, la ANGPT-1 es incapaz de estimular la proliferación de células endoteliales pero es indispensable para estabilizar estas células y las células de músculo liso (5). La ANGPT-1 es capaz de inducir la fosforilación de Tie-2, que desencadena su acción biológica. La ANGPT-2 se une al Tie-2 con la misma afinidad que la ANGPT-1, pero no fosforila al receptor, por lo tanto, actúa como un antagonista natural de ANGPT-1 (5). Trabajos previos han demostrado la expresión de ARNm de VEGF, ANGPT-1 y 2 en el ovario de la rata (5), bovinos (6) y monos (7), lo que sugiere el rol de estos factores en la angiogénesis ovárica. Otro factor angiogénico potente es el PDGF, que recluta las células periendotheliales (pericitos y células de músculo liso) actuando concertadamente con el sistema de ANGPT (8). En particular, se ha encontrado expresión de miembros de la familia de PDGF en ovarios de ratones, ratas y humanos (9). Los efectos biológicos de estos factores están mediados por dos receptores del tipo tirosina-quinasa, receptores PDGF α y β . Las isoformas PDGFA, PDGFB y PDGFC se unen al receptor PDGF α , mientras que PDGFB y PDGFD se unen al receptor PDGF β .

En ovario de rata se ha descrito la expresión y localización celular de ANGPT-1, ANGPT-2 y de su receptor Tie-2, así como también el de VEGF y su receptor FLK-1, durante la foliculogénesis (10). Además, en nuestro laboratorio se ha demostrado que la inhibición de VEGF y ANGPT-1, mediante la administración local en el ovario de rata de Trap (inhi-

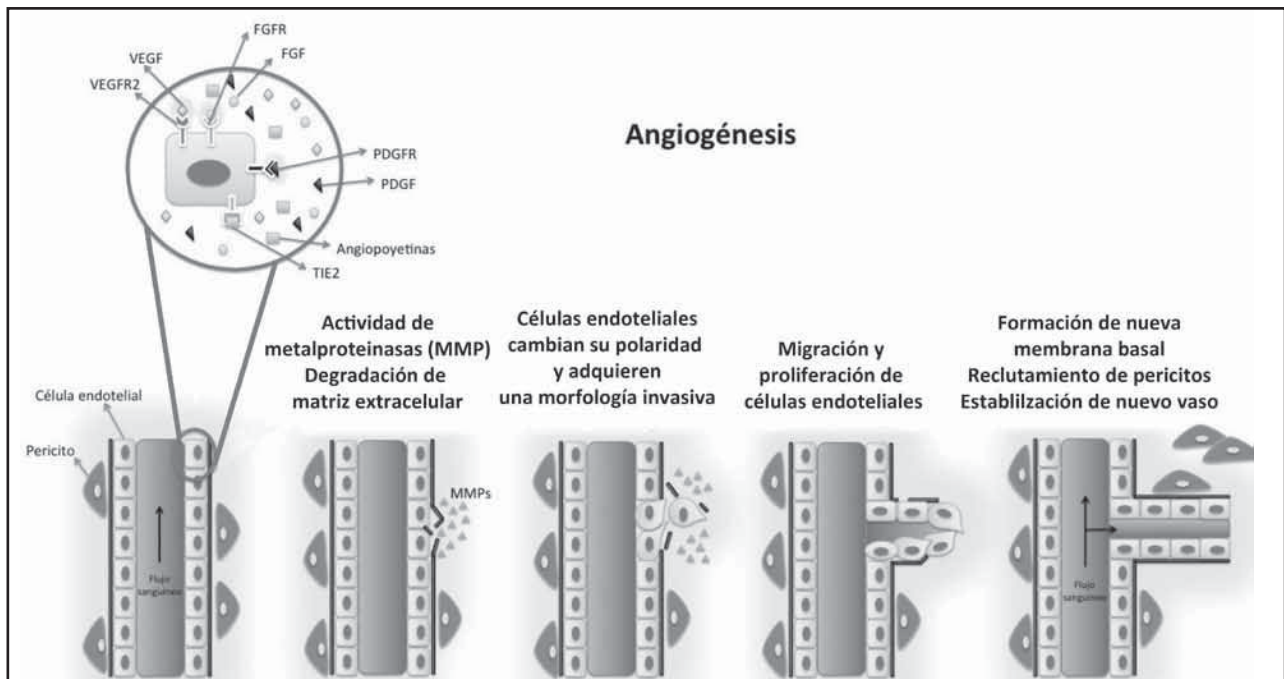


Figura 1. Descripción de los distintos pasos de la angiogénesis.

bidor de VEGF) o de un anticuerpo neutralizante anti-ANGPT-1, causa un desbalance en la relación proteínas antiapoptóticas: proapoptóticas, que lleva a un gran número de folículos a la atresia (11,12).

Por otra parte, recientemente hemos observado que un inhibidor selectivo de los receptores PDGF (AG1295) aumenta el número de folículos atrésicos en ovarios procedentes de ratas tratadas con gonadotrofinas. En este mismo modelo, el tratamiento con AG1295 provoca la aparición de folículos hemorrágicos (*resultados no publicados aún*). Estos resultados sugieren que la inhibición del sistema de PDGF provoca la falta de reclutamiento de células periendotheliales en el ovario, que son esenciales para la madurez de los vasos recién formados.

Esto es de especial interés debido a que los defectos en la angiogénesis ovárica contribuyen a una variedad de desórdenes, incluyendo anovulación e infertilidad, pérdida de embarazo, SHEO, SOP y neoplasmas ováricos (13,14).

Angiogénesis alterada I: síndrome de hiperestimulación ovárica (SHEO)

El SHEO es una complicación iatrogénica severa del crecimiento y la maduración folicular ocasionada por la inducción de la ovulación en tratamientos de fertilización asistida (ART), en los cuales se realiza hiperestimulación ovárica con altas dosis de gonadotrofinas. La prevalencia de SHEO se encuentra entre el 5-10% de las pacientes que se someten a ART. Además, la forma severa de SHEO afecta al 0,5-5% de estas pacientes y son necesarios cuidados intensivos inmediatos. Se han descrito varios sistemas de clasificación del SHEO, si bien el más aceptado es el de Golan y cols. (1988) (15), quienes lo clasifican en tres estadios y 5 grados:

Estadio leve: *grado 1:* presencia de distensión/malestar abdominal; *grado 2:* igual al anterior, más vómitos o diarrea y ovarios de 5-12 cm.

Estadio moderado: *grado 3:* características similares al grado leve más la presencia ecográfica de ascitis.

Estadio severo: *grado 4:* características similares al grado moderado, más signos de ascitis/hidrotórax o dificultad respiratoria y *grado 5:* todo lo anterior, más cambios en el volumen sanguíneo, aumento de la viscosidad sanguínea por hemoconcentración, trastornos de la coagulación, alteraciones de la función renal y problemas tromboembólicos.

Actualmente, los criterios utilizados para predecir el desarrollo de SHEO son: niveles de estradiol (E2) (mayor de 4000 pg/ml), número de folículos en el día de administración de gonadotrofina coriónica humana (hCG) (más de 20 folículos mayores a 18 mm)

y la presencia de ovarios poliquísticos por ultrasonido. Las características del síndrome involucran: aumento en el tamaño del ovario, sobreproducción de hormonas esteroideas y sustancias vasoactivas, que contribuyen al aumento de permeabilidad vascular, presencia de ascitis y formación de quistes, que pueden involucrar al tejido luteínico y ser hemorrágicos. Estas características estarían indicando que la angiogénesis juega un papel importante en el desarrollo de esta patología, si bien en la actualidad es escasa la información disponible acerca de la patofisiología de la enfermedad y de sus posibles tratamientos. A pesar del monitoreo de la ovulación por ultrasonido y de la medición de los niveles de E2, estas medidas son aún insuficientes para detectar los casos de SHEO. Debido a ello, actualmente se aplican además otras medidas para evitar una respuesta ovárica exagerada; como son la cancelación del protocolo, disminución de la dosis de hCG y el reemplazo de hCG por agonistas de la GnRH como inductores de la ovulación. Se ha observado que los niveles séricos de VEGF aumentan y, por consiguiente, se incrementa la permeabilidad vascular luego de la administración de hCG en mujeres hiperestimuladas con riesgo a desarrollar SHEO (16).

Angiogénesis alterada II: SOP

El SOP es un síndrome complejo caracterizado por una disfunción ovárica que frecuentemente se presenta asociado a la resistencia a la insulina como condición sistémica. Sus manifestaciones se observan no solo durante la edad reproductiva de la mujer, sino a través de toda su vida, con riesgo de padecer diabetes tipo 2, síndrome metabólico y con las consiguientes complicaciones psicológicas que genera, como ansiedad y depresión. Sus principales características son el hiperandrogenismo y la morfología de ovario poliquístico (17). Presenta como principales manifestaciones clínicas la infertilidad, ausencia o irregularidades menstruales, signos de exceso de andrógenos y obesidad (18).

A pesar de ser la alteración endocrina con mayor prevalencia entre las mujeres en edad fértil, su definición aún es controvertida y muchos aspectos de su patofisiología aún no se conocen. Se han realizado varios consensos respecto al diagnóstico de esta patología; actualmente se acepta el acordado en 2003 en Rotterdam, en el que participaron la *European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE) y la *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM) (19). En esa reunión se concluyó que el SOP es un síndrome caracterizado por diversos signos y síntomas, por lo que la presencia de uno solo de ellos no es suficiente para realizar un diagnóstico. Por ello, se diagnostica a una paciente con SOP cuando presenta al menos dos de los siguientes síntomas: hiperandrogenismo clínico o bioquímico, oligo o anovulación y ovarios

poliquísticos por ultrasonido. Además, el SOP continúa siendo definido como un síndrome, es decir, no existe un único criterio para su diagnóstico. Más aún, continúa siendo también un diagnóstico de exclusión, donde es necesario descartar la presencia de otras alteraciones endocrinas conocidas que puedan estar produciendo los mismos signos y síntomas para diagnosticar SOP (19).

Las pacientes con SOP tienen altos niveles de VEGF en suero (20,21), el que proviene de una elevada producción ovárica (22). Por esta razón, tienen mayor riesgo de desencadenar SHEO al ser estimuladas con gonadotrofinas (20). El VEGF es el principal candidato involucrado en la patogénesis de SHEO (23), es por esto que las pacientes con SOP, al tener niveles basales elevados de VEGF, son pacientes de riesgo en el caso de una estimulación de la ovulación.

En el SOP el mecanismo autocrino/paracrino en el ovario que culmina con la ovulación de un solo folículo se encuentra alterado. Una de las causas de esta pérdida en la regulación sería el aumento en la expresión de VEGF por las células ováricas, lo que produciría un aumento en el flujo sanguíneo de la cohorte de folículos en desarrollo, que inhibe la atresia folicular y por consiguiente, produce un crecimiento de muchos folículos en forma simultánea en estas pacientes cuando son estimuladas con gonadotrofinas (11). Esta es una de las causas por las que se trata de evitar los protocolos de inducción de la ovulación clásicos y se intenta utilizar el citrato de clomifeno (CC) como primera línea de tratamiento.

En modelos animales de SOP, se ha visto que además del aumento de VEGF en ovario, también está aumentado el sistema de ANGPT y existe un mayor recubrimiento de los vasos sanguíneos con células periendotheliales. En fluido folicular humano proveniente de pacientes con SOP, también se ha encontrado un aumento del sistema de ANGPT-1 (*resultados preliminares*). Es por esto que se propone el estudio de los factores angiogénicos como estrategia de diagnóstico y/o tratamiento para este síndrome (24).

Angiogénesis alterada III: neoplasmas ováricos

Hemos nombrado las características de la angiogénesis fisiológica en cuanto a su transitoriedad y su fina regulación. Las células tumorales producen grandes cantidades de los factores angiogénicos aquí descritos, lo que causa un efecto positivo promoviendo un aumento de la angiogénesis en los tumores. La forma en la cual se da este proceso es objeto de numerosos estudios.

El cáncer de ovario es uno de los tipos de tumores sólidos cuya respuesta a los tratamientos es generalmente temporal. En la mayoría de los casos es recurrente y entre las enfermedades ginecológicas, es una de las que posee una mayor relación fatalidad/caso. Cada año

existen más de 190.000 casos de cáncer de ovario y éste representa el 4% de todos los tipos de cánceres diagnosticados en las mujeres a nivel mundial. Debido a la ausencia de síntomas específicos en los estadios tempranos de esta enfermedad, no existe una estrategia para su detección y al momento de ser diagnosticado, el 75% de los casos ya es completamente metastásico.

El 90% de los casos de cáncer de ovario ocurre de forma esporádica en la población y solo el 10% posee un componente hereditario (25). Cuando esta enfermedad se encuentra en su estadio más avanzado, el mejor tratamiento sería realizar una cirugía apropiada, pero el problema es que no se logra erradicar hasta el último residuo de tejido y por eso se hace imprescindible administrar quimioterapia en la mayoría de las pacientes. La prognosis de esta enfermedad puede estar correlacionada con numerosos factores clínicos y biológicos. El estadio tumoral, el grado de avance y el tamaño de la metástasis se correlaciona con el resultado final luego de la reducción del tumor (26,27). El grado de malignidad de los tumores se clasifica de acuerdo con la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) y abarca los estadios I a IV, que involucran crecimiento del tumor limitado a los ovarios hasta metástasis distante del sitio de origen.

Haciendo mención nuevamente a la terapéutica del cáncer de ovario, cabe destacar que los agentes quimioterapéuticos que se utilizan provocan infertilidad y pérdida en la producción de hormonas sexuales. La combinación de la radioterapia y quimioterapia es la más dañina y en casi el 100% de las pacientes tratadas se desarrolla falla ovárica (28). Además, existen pacientes que recaen y resultan ser resistentes a estas terapias y en estos casos existen limitadas opciones de tratamiento. Es por esta razón que actualmente se están buscando nuevas moléculas blanco, que generalmente consisten en factores asociados a caminos intracelulares de los cuales las células tumorales dependen en cuanto a su proliferación, invasión, metástasis y apoptosis. Debido a esto se están identificando moléculas para futuras terapias que se encuentren alteradas en las células tumorales y que favorezcan su fenotipo tumoral. Estas células poseen diversos procesos alterados, como son: el ciclo celular, caminos intracelulares de señalización, mecanismos angiogénicos y síntesis de receptores de factores de crecimiento. Los vasos sanguíneos intratumorales son muy diferentes de los vasos normales en cuanto a su estructura, función y permeabilidad, lo que dificulta la transferencia de oxígeno y nutrientes, e incluso, de los agentes quimioterapéuticos a las células tumorales (29). La angiogénesis tumoral es un proceso crítico involucrado en el crecimiento y en la metástasis del cáncer de ovario. En cuanto a la inhibición de la angiogénesis como terapia para el tratamiento del

cáncer de ovario, se han realizado diversas estrategias con diferentes blancos, como el VEGF y su receptor por medio de dos estrategias: previniendo la unión del receptor al VEGF o previniendo la activación a nivel intracelular (30). Uno de los primeros compuestos que demostraron poseer efectos significativos en carcinoma de ovario es el bevacizumab, un anticuerpo monoclonal que se une a VEGF, bloqueando su interacción con su receptor. Además, este agente mostró buenos resultados en pacientes con cáncer de ovario recurrente en el 16% de las pacientes sensibles a cisplatino y en el 18% de las pacientes resistentes a éste. Incluso en estos ensayos se ha observado un aumento del período libre de enfermedad, del tradicional 16% al 42% a los 6 meses (31). Sin embargo, en cuanto al tratamiento con bevacizumab, se han realizado distintos ensayos clínicos (GOG 218 e ICON 7) donde se analizó el tiempo y la dosis del inhibidor en combinación con la administración de los quimioterapéuticos. A pesar de los resultados beneficiosos en cuanto al aumento de los períodos libres de enfermedad al combinar bevacizumab con quimioterapia, no se observa aumento en la supervivencia global. Esto, junto con algunos efectos adversos que se observan con estos compuestos y el alto costo que poseen, hace dudar de su real beneficio (32).

Ensayos in vitro e in vivo para estudiar la angiogénesis ovárica en el tracto reproductivo femenino

Sobre la base de lo descrito anteriormente, la angiogénesis ovárica juega un rol importante en la aparición o desarrollo de SHEO y SOP, como en el cáncer ovárico.

Es decir, el endotelio es una fuente y un blanco de sustancias vasoactivas que son secretadas debido a las condiciones que se desencadenan durante estas enfermedades descriptas. Para evaluar los mecanismos bioquímicos y moleculares que participan se han desarrollado métodos in vitro e in vivo.

Se detallarán a continuación los métodos más relevantes para estudiar la angiogénesis en el tracto reproductivo femenino tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

Ensayos in vitro de angiogénesis

Cultivo de células endoteliales

La migración de células endoteliales es esencial para la angiogénesis. Este proceso de movilidad es direccionalmente regulado por quimiotaxis y estímulos mecanotácticos. Además, implica la degradación de la matriz extracelular para permitir la migración de las células. Distintas vías de señalización se activan y convergen en la remodelación del citoesqueleto. A continuación, las células endoteliales se extienden, contraen y avanzan. Se ha observado que el sistema angiogénico de ANGPT no estimula la proliferación de las células endoteliales, sin embargo, la ANGPT-1 promueve la migración de estas células (33). Una de las formas de evaluar los diferentes parámetros de la angiogénesis es la utilización de cultivos de células endoteliales y la posterior observación de la migración celular frente a distintos tratamientos (34). Sobre la base de ello, se realizó el ensayo de migración de herida en una línea endotelial humana. Este ensayo ha

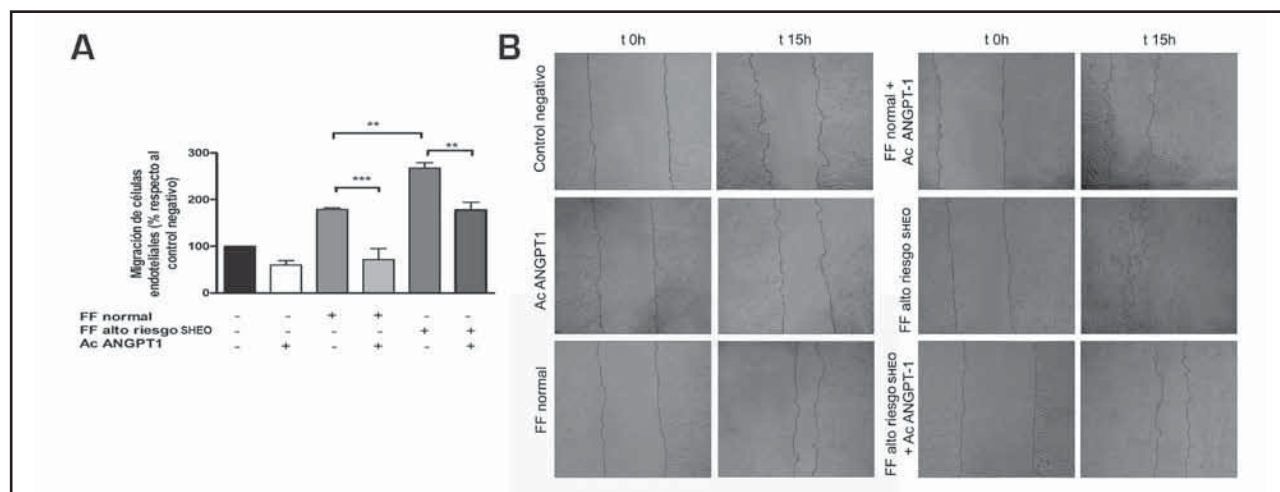


Figura 2. Efecto del fluido folicular en la migración de células endoteliales. A) Cuantificación del ensayo de migración por herida. Las columnas muestran el porcentaje de migración de células endoteliales respecto al control negativo. La migración de células endoteliales en el control negativo fue arbitrariamente definida como del 100%. Los datos se expresaron como la media \pm EMS (n=20); *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. **B)** Imágenes representativas de la migración endotelial en el ensayo de migración por herida inducida por fluido folicular de pacientes normales y con alto riesgo de desarrollar SHEO preincubado durante 1 hora a 37 °C con un anticuerpo anti-ANGPT-1 y sin él. Las imágenes fueron tomadas inmediatamente después de realizar la herida en el cultivo (tiempo 0 (t=0) y 15 horas más tarde (t=15). **FF:** fluido folicular; **SHEO:** síndrome de hiperestimulación ovárica; **Ac ANGPT-1:** anticuerpo antiangiopoyetina-1.

sido utilizado por más de 40 años y se caracteriza por la habilidad que tienen las células para migrar en una pequeña área creada libre de células. Este método ha sido útil no solo para evaluar los factores involucrados en la migración celular, sino también para evaluar el rol de las proteínas de la matriz extracelular, así como de las proteínas que participan de las uniones intercelulares (35). En particular, uno de los objetivos de nuestro laboratorio fue analizar el potencial angiogénico que tienen los fluidos foliculares (FF) provenientes de pacientes con riesgo de desarrollar SHEO utilizando el ensayo de migración por herida (36) (**FIGURA 2**). Los resultados mostraron que los FF de estas pacientes estimulan la migración celular, comparados con los FF de pacientes controles. Sin embargo, cuando se agrega un anticuerpo neutralizante anti-ANGPT-1 (inhibidor) a los FF provenientes de pacientes con alto riesgo a SHEO, se observa una disminución en la migración de células endoteliales, por lo que este proceso angiogénico evidencia valores normales.

Una vez que las células endoteliales han migrado y proliferado en respuesta al estímulo angiogénico, se diferencian para producir nuevos capilares. Entre los diversos ensayos *in vitro* que mimetizan este proceso de diferenciación que sufren las células endoteliales en la angiogénesis, se emplea muy frecuentemente el de la formación de estructuras tubulares en Matrigel (mezcla de proteínas gelatinosas secretadas por células tumorales de ratón, que mimetiza el ambiente extracelular encontrado en varios tejidos). Las células endoteliales de cordón umbilical (HUVEC) han sido las principales células utilizadas en este tipo de ensayos. Otros autores y en nuestro laboratorio hemos realizado ensayos de tubulogénesis en cultivos de células endoteliales con Matrigel utilizando los FF o el suero proveniente de pacientes normales, así como de pacientes con distintas patologías (37, 38). Von Otte y cols. observaron que en ausencia de factores angiogénicos o de FF de pacientes normales se encuentra una estructura tipo tubular de forma incompleta, irregular y pequeña en los cultivos de células endoteliales (37). Tan y cols. observaron un aumento en la formación de túbulos con suero de pacientes SOP, efecto que fue revertido luego de 6 meses de tratamiento con el hipoglucemiante metformina (38). En nuestro laboratorio, hemos observado que en presencia de FF de pacientes con riesgo elevado de padecer SHEO, aumenta la formación de estructuras del tipo tubular endotelial comparado con los FF de pacientes normales. Estos resultados son consistentes con los ensayos de migración ya que explicarían la excesiva angiogénesis que poseen las pacientes con riesgo elevado de desarrollar este síndrome.

En cáncer de ovario, este tipo de ensayo se utiliza, por ejemplo, para evaluar la secreción de factores an-

giogénicos por parte de células tumorales. Un ejemplo es el trabajo donde se ha demostrado que al incubar células correspondientes a una línea tumoral ovárica en presencia de metaloproteinasa 1 (MMP1), el medio condicionado de estas células induce la formación de estructuras tubulares en comparación con el medio condicionado de células incubadas en ausencia de estímulo. Esto demuestra que la MMP1 estimula la secreción de factores angiogénicos por parte de células ováricas tumorales (39).

El proceso angiogénico no solo involucra proliferación, adhesión, migración de células endoteliales y formación de túbulos, sino también cambios en el citoesqueleto. Es decir, se producen cambios en la permeabilidad vascular que están dados por la integridad de las uniones estrechas y adherentes entre las células endoteliales. Estas uniones regulan el pasaje de iones, nutrientes y diferentes fluidos desde el espacio intravascular al espacio periférico donde se encuentran los tejidos. Una manera para medir permeabilidad vascular es mediante la técnica de faloidina. Los filamentos de actina polimerizados se unen con el péptido de faloidina que está conjugado a marcadores fluorescentes. Estos filamentos son cruciales para el mantenimiento de las uniones entre células endoteliales, regulando de esta manera la permeabilidad vascular. Levin y cols. (1998) mostraron una marcada redistribución de filamentos de actina en forma transversal cuando las células endoteliales eran incubadas en presencia de VEGF o de FF de pacientes normales comparadas con controles (40). Además, nosotros hemos observado que los FF de pacientes con riesgo elevado de desarrollar SHEO generan filamentos de actina en forma transversal a lo largo de la célula, lo que provoca la formación de fibras de estrés de actina comparados con los FF de pacientes normales.

Cultivos mixtos (cocultivos)

Los cultivos mixtos son muy interesantes porque nos permiten reproducir las condiciones fisiológicas en las que se encuentran las células en el organismo y permiten investigar las interacciones entre ellas. Se pueden desarrollar cultivos mixtos combinando dos cultivos primarios, cultivos primarios con líneas celulares o dos líneas celulares distintas. Es decir, todos estos cultivos mimetizan un microsistema semejante al de los fisiológicos. En particular, en el área reproductiva, varios autores han utilizado estos tipos de cultivos para evaluar los distintos mecanismos que se desencadenan luego de la unión de gonadotropinas o factores pro y antiangiogénicos a sus receptores presentes en los distintos tipos celulares. Rodewald y cols. (2009) establecieron un nuevo modelo *in vitro* de cocultivo de células de granulosa luteínicas humanas con células endoteliales humanas. Los autores mostraron los efectos de la hCG sobre la

permeabilidad celular y la expresión de claudina 5 (proteína que participa en las uniones estrechas endoteliales y regula la permeabilidad celular) en presencia de un inhibidor de VEGF. Los resultados mostraron que la hCG actúa como un factor paracrino aumentando la permeabilidad endotelial mediante la secreción de VEGF por células de la granulosa luteínicas humanas y por consiguiente, causando una disminución de la expresión de claudina 5 en las células endoteliales (41).

Ensayo ex vivo de angiogénesis

Cultivo de anillos de la aorta

Este ensayo se caracteriza por representar varios pasos de la angiogénesis que incluyen la proliferación de células endoteliales, migración, diferenciación en nuevos capilares y recubrimiento de pericitos (42). El ensayo consiste en extraer la aorta torácica de la rata, removerle el tejido conectivo y cortar la aorta en diferentes segmentos pequeños tipo “anillo”. Luego son embebidos en una matriz extracelular tridimensional compuesta por fibrina o colágeno y se mantiene en un medio específico. Este tejido comprende 3 diferentes tipos celulares: células endoteliales, células fibroblásticas y células de músculo liso. Luego de varios días de cultivo se puede observar la formación de nuevos microcapilares a partir del explante de la aorta en presencia de factores con actividad proangiogénica. Un ejemplo es el estudio realizado por Berndt y cols. (2009), donde demuestran que la hCG se comporta no solo como un factor que modula la implantación embrionaria mediante el control de la secreción del factor inhibitorio de leucemia (LIF) y la producción de la metaloproteinasa-9, sino también como un factor proangiogénico (43). Para ello utilizaron, entre otros ensayos, el cultivo de los anillos de la aorta en presencia de distintas concentraciones de hCG recombinante y urinaria luego de 9 días de cultivo. La hCG aumentó no solo el número de nuevos capilares, sino también la distancia de la migración celular desde el explante, lo que indica que esta gonadotropina cumple también un rol importante en la angiogénesis.

Ensayos in vivo de angiogénesis

Ensayo de la córnea

La córnea es un modelo ideal para evaluar la angiogénesis in vivo, ya que se caracteriza por ser avascular y, por lo tanto, el desarrollo de nuevos vasos será solamente debido al material que se agregue (44). Originalmente fue desarrollado en ojo de conejo pero luego fue adaptado al ratón. El ensayo consiste en realizar una abertura en la córnea, donde se coloca el componente de interés. La respuesta angiogénica puede ser monitoreada por observación mediante lupa o midiendo el área de penetración de los vasos mediante técnicas fluorescentes.

La única desventaja de este ensayo es el desarrollo de inflamación, que puede llegar a interferir en la visualización de la neovascularización en la córnea. En el área reproductiva femenina, este ensayo in vivo de angiogénesis podría ser utilizado en el futuro para evaluar el potencial angiogénico que poseen el líquido peritoneal, los sueros y los FF provenientes de pacientes con distintas patologías.

Ensayo del implante de Matrigel

Este ensayo, comparado con el ensayo de la córnea, no requiere herramientas técnicas específicas de cirugía (45). El Matrigel contiene previamente las sustancias para evaluar y se administra en forma subcutánea. Luego de varios días, el implante puede ser examinado en forma histológica para determinar el desarrollo de vasos sanguíneos que han penetrado al Matrigel. Se puede medir el volumen del plasma mediante la administración de dextrán conjugado a un marcador fluorescente o también mediante la cuantificación de hemoglobina que se encuentra dentro del implante de Matrigel (46). Por ejemplo, Johns A y cols. (1996) demuestran que los estrógenos modulan la angiogénesis tanto en condiciones fisiológicas como patológicas mediante la inducción del factor de crecimiento fibroblástico tipo B (FGFb). Para ello, utilizaron ratones transgénicos sin receptor de estrógenos y ratones salvajes, y luego los ovariectomizaron. Se evaluó el volumen de plasma dentro del implante de Matrigel que contenía FGFb que había sido implantado subcutáneamente en ambos tipos de ratones. En ratones salvajes, la administración de 17β -estradiol aumentó el volumen del plasma del implante de Matrigel medido por dextrán conjugado a fluoresceína, comparado con el de los ratones transgénicos.

Ensayo de membrana corionalantoide (CAM)

Este ensayo fue originalmente descrito por embriólogos hace 50 años atrás con el objetivo de evaluar el desarrollo de órganos en el embrión. El sistema de vasos sanguíneos de la CAM es inmunodeficiente y similar a la placenta de mamíferos en cuanto a la ausencia de inervación. Además, otra ventaja de este ensayo es que el sistema inmune y nervioso del embrión propiamente dicho no se han desarrollado aún. Sobre la base de estas características, el ensayo de la CAM puede ser utilizado para realizar xenotrasplante con distintos tipos de tejidos que provienen de diferentes especies. Este sistema de la CAM se utiliza para evaluar la angiogénesis tanto en tumores como en tejidos endometriales (47,48), para cultivo de piel humana (49) y de hígado (50), así como también para analizar la toxicidad de biomateriales para ingeniería de tejidos (51).

Al principio, las CAM de los días 7-9 de em-

briones de pollo eran expuestas mediante una pequeña abertura en la cáscara del huevo y los fragmentos de tejido de interés eran colocados directamente arriba de la CAM (52). Los huevos eran reincubados por varios días, y las CAM, junto con los fragmentos tisulares, eran analizadas mediante la cuantificación de los puntos de bifurcación de los nuevos capilares que se encontraban dentro del área de interés (lugar donde se había colocado el material tisular).

Luego se realizó una modificación al ensayo CAM (método in ovo) que consistía en transferir el embrión completo a placas de cultivo de plástico (53). Luego de 3-4 días de incubación, durante los cuales la CAM se desarrolla, se agregan los fragmentos de tejido para evaluar su actividad angiogénica. Las sustancias pueden ser ubicadas en la CAM directamente o sobre anillos de siliconas para delimitar la zona de crecimiento vascular que se evaluará.

Las ventajas que posee este método in vivo para evaluar la angiogénesis son la disponibilidad universal de huevos, relativo bajo costo, rápido desarrollo y crecimiento de los embriones y adecuación a normas éticas vigentes para el uso de animales de experimentación. Además, se pueden llevar a cabo varios tratamientos en la misma CAM, lo que permite que los resultados sean muy confiables. Recientemente, Isachenko y cols. (2012) han propuesto al sistema de la CAM como una técnica para evaluar la calidad de tejido ovárico que fue previamente criopreservado (54). Es importante destacar que la infertilidad aumenta en aquellas mujeres que fueron sometidas a quimioterapia, ya que es un tratamiento que puede dañar las gónadas. La criopreservación de material ovárico antes de la terapia quimioterapéutica con reimplantación posterior representa una buena solución para restablecer la fertilidad en este tipo de pacientes.

En nuestro laboratorio, hemos puesto a punto este ensayo pero en embriones de codorniz. Estos se incubaron in ovo durante 2 días a 37 °C. Durante el desarrollo ex ovo (embrión desarrollado en una placa de cultivo) se realizó un control de la viabilidad cada 48 h. Luego de los 5 días de incubación ex ovo se colocaron como estímulo los FF, en discos de filtros, de las pacientes con riesgo de desarrollar SHEO y de pacientes normales. Luego de las 48 h postestimulación, los embriones fueron sacrificados y las CAM fueron fijadas en 4% paraformaldehído/2% glutaraldehído en PBS. Los resultados mostraron que los FF de pacientes con riesgo de SHEO causaban un mayor número de ramificaciones vasculares, así como un aumento en el calibre vascular, comparados con los FF de pacientes normales (**FIGURA 3**). En cambio, cuando los FF de SHEO fueron incubados con un inhibidor del factor angiogénico ANGPT-1, se observó una disminución en los parámetros analiza-

dos anteriormente comparados con los FF de pacientes SHEO sin tratamiento. Una de las ventajas de este ensayo es que se pueden analizar otros parámetros además de los estudios morfológicos. Por ejemplo, en las CAM, se puede llevar a cabo la técnica de inmunofluorescencia (IF) para detectar células endoteliales (factor Von Willebrand) y células de músculo liso (α -actina). En nuestro laboratorio, observamos que los FF de SHEO mostraban un aumento tanto en el área endotelial como en la periendothelial, comparados con los FF normales. En cambio, la presencia del inhibidor de ANGPT-1 en los FF de SHEO disminuía en las áreas celulares mencionadas anteriormente respecto a los FF de SHEO sin tratamiento. También, se pueden realizar estudios bioquímicos, cuantificando mediante ensayos de Elisa los niveles de la integrina $\alpha v \beta 3$, que se consideran un parámetro angiogénico (55). Los resultados mostraron un aumento de esta integrina en las CAM incubadas con los FF de pacientes con riesgo de desarrollar SHEO, comparados con los FF de pacientes normales. En cambio, la presencia del inhibidor de ANGPT-1 disminuyó los niveles de esta proteína. Es decir, que no solo el VEGF se encuentra involucrado en la severidad del SHEO, sino que también participa otro factor angiogénico, como es la ANGPT-1.

Conclusiones

Los ensayos in vitro de angiogénesis resultan útiles para llevar a cabo cuantificaciones bajo controles estrictos pero deben de ser interpretados con gran precaución. Estos ensayos pueden servir para validar los primeros pasos de la angiogénesis (proliferación, migración, adhesión y formación de túbulos) pero deben ser confirmados por estudios in vivo. Los cultivos de órgano (ensayo del anillo de la aorta) y los cocultivos (células endoteliales y células de músculo liso) proveen mayor información que los ensayos in vitro ya que permiten evaluar las interacciones entre distintos tipos celulares que participan en el desarrollo de nuevos vasos. Los ensayos in vivo son absolutamente necesarios para evaluar en forma estricta todos los pasos angiogénicos sin eliminar la posible participación de otros sistemas que ocurren alrededor del desarrollo de una nueva vasculatura. La desventaja de estos ensayos in vivo es que son difíciles de desarrollar ya que requieren en su mayoría conocimientos de cirugía o de la técnica propiamente dicha para llevarlos a cabo. En particular, los ensayos in vitro e in vivo que fueron descritos en este trabajo para evaluar el desarrollo de los vasos, pueden ser aplicados para el estudio de enfermedades reproductivas femeninas con alteraciones en la angiogénesis (SHEO, SOP, cáncer de ovario, etc.) mediante la utilización del suero, líquido peritoneal, fluido folicular o de biopsias de distintos tejidos.

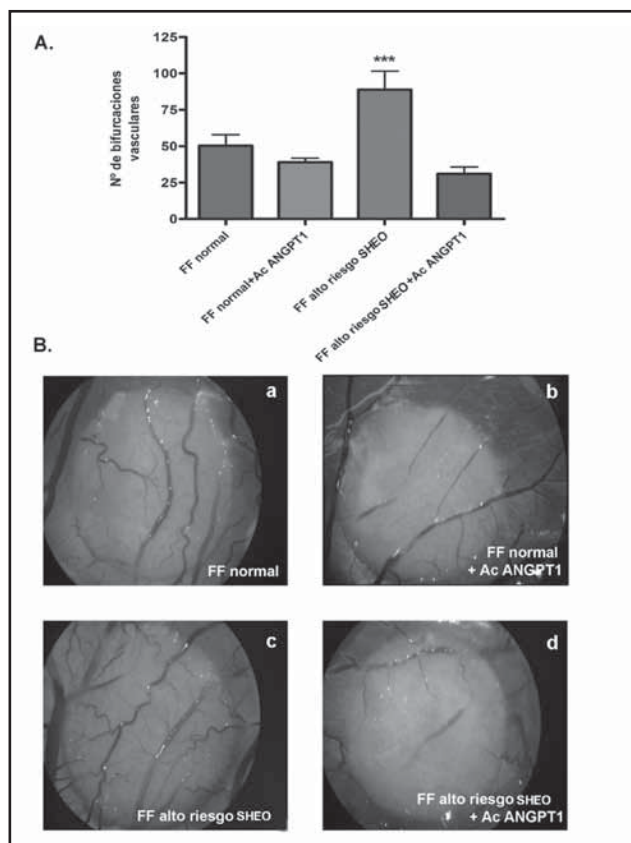


Figura 3. Efecto del fluido folicular en un modelo de angiogénesis in vivo (CAM, membrana corioalantoidea de embrión de codorniz). **A)** Cuantificación de las bifurcaciones vasculares en el ensayo CAM. Los datos se expresaron como la mediana \pm EMS (n=20); ***p<0,001. **B)** Imágenes representativas de las CAM incubadas **(a)** con fluidos foliculares de pacientes normales, **(b)** con fluidos foliculares de pacientes normales con el agregado de un anticuerpo neutralizante anti-ANGPT-1, **(c)** con fluidos foliculares de pacientes con alto riesgo a desarrollar SHEO y **(d)** con fluidos foliculares de pacientes con alto riesgo a desarrollar SHEO con el agregado de un anticuerpo neutralizante anti-ANGPT-1. **FF:** fluido folicular; **SHEO:** síndrome de hiperestimulación ovárica; **Ac ANGPT-1:** anticuerpo antiangiopoyetina-1.

Referencias

1. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997;386(6626):671-674.
2. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 2000;407(6801):242-248.
3. Findlay JK. Angiogenesis in reproductive tissues. *J Endocrinol*. 1986;111(3):357-366.
4. Otrrock ZK, Mahfouz RA, Makarem JA, Shamseddine AI. Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cells Mol Dis*. 2007;39(2):212-220.
5. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*. 1997;277(5322):55-60.

6. Goede V, Schmidt T, Kimmina S, Kozian D, Augustin HG. Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. *Lab Invest*. 1998;78(11):1385-1394.
7. Hazzard TM, Molskness TA, Chaffin CL, Stouffer RL. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietin regulation by gonadotrophin and steroids in macaque granulosa cells during the peri-ovulatory interval. *Mol Hum Reprod*. 1999;5(12):1115-1121.
8. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev*. 1999;79(4):1283-1316.
9. Sleer LS, Taylor CC. Cell-type localization of platelet-derived growth factors and receptors in the postnatal rat ovary and follicle. *Biol Reprod*. 2007;76(3):379-390.
10. Abramovich D, Rodriguez CA, Hernandez F, Tesone M, Parborell F. Spatiotemporal analysis of the protein expression of angiogenic factors and their related receptors during folliculogenesis in rats with and without hormonal treatment. *Reproduction*. 2009;137(2):309-320.
11. 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(3):434-441.
12. Parborell F, Abramovich D, Tesone M. Intrabursal administration of the antiangiopoietin 1 antibody produces a delay in rat follicular development associated with an increase in ovarian apoptosis mediated by changes in the expression of BCL2 related genes. *Biol Reprod*. 2008;78(3):506-513.
13. Neulen J, Yan Z, Raczek S, Weindel K, Keck C, Weich HA, et al. Human chorionic gonadotropin-dependent expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in human granulosa cells: importance in ovarian hyperstimulation syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80(6):1967-1971.
14. Geva E, Jaffe RB. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. *Fertil Steril*. 2000;74(3):429-438.
15. Golan A, Ron-EI R, Herman A, Soffer Y, Weinraub Z, Caspi E. Ovarian hyperstimulation syndrome: an update review. *Obstet Gynecol Surv*. 1989;44(6):430-440.
16. 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(3):482-489.
17. Laven JS, Imani B, Eijkemans MJ, Fauser BC. New approach to polycystic ovary syndrome and other forms of anovulatory infertility. *Obstet Gynecol Surv*. 2002;57(11):755-767.
18. Norman RJ, Davies MJ, Lord J, Moran LJ. The role of lifestyle modification in polycystic ovary syndrome. *Trends Endocrinol Metab*. 2002;13(6):251-257.
19. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod*. 2004;19(1):41-47.
20. Agrawal R, Sladkevicius P, Engmann L, Conway GS,

- Payne NN, Bekis J, et al. Serum vascular endothelial growth factor concentrations and ovarian stromal blood flow are increased in women with polycystic ovaries. *Hum Reprod.* 1998;13(3):651-655.
21. Artini PG, Monti M, Matteucci C, Valentino V, Cristello F, Genazzani AR. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in polycystic ovary syndrome during controlled ovarian hyperstimulation. *Gynecol Endocrinol.* 2006;22(8):465-470.
 22. Agrawal R, Jacobs H, Payne N, Conway G. Concentration of vascular endothelial growth factor released by cultured human luteinized granulosa cells is higher in women with polycystic ovaries than in women with normal ovaries. *Fertil Steril.* 2002;78(6):1164-1169.
 23. McClure N, Healy DL, Rogers PA, Sullivan J, Beaton L, Haning RV, Jr., et al. Vascular endothelial growth factor as capillary permeability agent in ovarian hyperstimulation syndrome. *Lancet.* 1994;344(8917):235-236.
 24. Abramovich D, Irusta G, Bas D, Cataldi NI, Parborell F, Tesone M. Angiopoietins/TIE2 System and VEGF Are Involved in Ovarian Function in a DHEA Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocrinology.* 2012;153(7):3446-3456.
 25. Cramer DW. Epidemiology and biostatistics. In: Berek JS, Hacker NF, ed. *Practical gynecology oncology.* Philadelphia: Williams and Wilkins, 2000.
 26. Beller U, Halle D, Catane R, Kaufman B, Hornreich G, Levy-Lahad E. High frequency of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in Ashkenazi Jewish ovarian cancer patients, regardless of family history. *Gynecol Oncol.* 1997;67(2):123-126.
 27. Burke W, Daly M, Garber J, Botkin J, Kahn MJ, Lynch P, et al. Recommendations for follow-up care of individuals with an inherited predisposition to cancer. II. BRCA1 and BRCA2. *Cancer Genetics Studies Consortium. JAMA.* 1997;277(12):997-1003.
 28. Cohen LE. Cancer treatment and the ovary: the effects of chemotherapy and radiation. *Ann NY Acad Sci.* 2008;1135:123-125.
 29. Jain RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med.* 2001;7(9):987-989.
 30. Martin L, Schilder R. Novel approaches in advancing the treatment of epithelial ovarian cancer: the role of angiogenesis inhibition. *J Clin Oncol.* 2007;25(20):2894-2901.
 31. Burger RA, Sill M, Monk BJ. Phase II trial of Bevacizumab in persistent or recurrent epithelial ovarian cancer or primary peritoneal cancer: A Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 2005;23.
 32. Hensley ML. Big costs for little gain in ovarian cancer. *J Clin Oncol.* 2011;29(10):1230-1232.
 33. Lamalice L, Le Boeuf F, Huot J. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res.* 2007;100(6):782-794.
 34. Albert C, Garrido N, Mercader A, Rao CV, Remohi J, Simon C, et al. The role of endothelial cells in the pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome. *Mol Hum Reprod.* 2002;8(5):409-418.
 35. Todaro GJ, Lazar GK, Green H. The initiation of cell division in a contact-inhibited mammalian cell line. *J Cell Physiol.* 1965;66(3):325-333.
 36. Scotti L, Abramovich D, Pascuali N, de Zuñiga I, Oubina A, Kopcow L, et al. Involvement of the ANGPTs/Tie-2 system in ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). *Mol Cell Endocrinol.* 2013;365(2):223-230.
 37. von Otte S, Paletta JR, Becker S, König S, Fobker M, Greb RR, et al. Follicular fluid high density lipoprotein-associated sphingosine 1-phosphate is a novel mediator of ovarian angiogenesis. *J Biol Chem.* 2006;281(9):5398-5405.
 38. Tan BK, Adya R, Farhatullah S, Chen J, Lehnert H, Randeve HS. Metformin treatment may increase omentin-1 levels in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes.* 2010;59(12):3023-3031.
 39. Agarwal A, Tressel SL, Kaimal R, Balla M, Lam FH, Covic L, et al. Identification of a metalloprotease-chemokine signaling system in the ovarian cancer microenvironment: implications for antiangiogenic therapy. *Cancer Res.* 2010;70(14):5880-5890.
 40. Levin ER, Rosen GF, Cassidenti DL, Yee B, Meldrum D, Wisot A, et al. Role of vascular endothelial cell growth factor in Ovarian Hyperstimulation Syndrome. *J Clin Invest.* 1998;102(11):1978-1985.
 41. Rodewald M, Herr D, Duncan WC, Fraser HM, Hack G, Konrad R, et al. Molecular mechanisms of ovarian hyperstimulation syndrome: paracrine reduction of endothelial claudin 5 by hCG in vitro is associated with increased endothelial permeability. *Hum Reprod.* 2009;24(5):1191-1199.
 42. Burbridge MF, West DC. Rat Aortic Ring: 3D Model of Angiogenesis In Vitro. *Methods Mol Med.* 2001;46:185-204.
 43. Berndt S, Blacher S, Perrier S, Thiry M, Tsampalas M, Cruz A, et al. Chorionic gonadotropin stimulation of angiogenesis and pericyte recruitment. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(11):4567-4574.
 44. Muthukkaruppan VR, Kubai L, Auerbach R. Tumor-induced neovascularization in the mouse eye. *J Natl Cancer Inst.* 1982;69(3):699-708.
 45. Passaniti A, Taylor RM, Pili R, Guo Y, Long PV, Haney JA, et al. A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Lab Invest.* 1992;67(4):519-528.
 46. Johns A, Freay AD, Fraser W, Korach KS, Rubanyi GM. Disruption of estrogen receptor gene prevents 17 beta estradiol-induced angiogenesis in transgenic mice. *Endocrinology.* 1996;137(10):4511-4513.
 47. Berube M, Deschambeault A, Boucher M, Germain L, Petitclerc E, Guerin SL. MMP-2 expression in uveal melanoma: differential activation status dictated by the cellular environment. *Mol Vis.* 2005;11:1101-1111.
 48. Nap AW, Dunselman GA, de Goeij AF, Evers JL, Groot-huis PG. Inhibiting MMP activity prevents the development of endometriosis in the chicken chorioallantoic membrane model. *Hum Reprod.* 2004;19(10):2180-2187.
 49. Kunzi-Rapp K, Ruck A, Kaufmann R. Characterization