



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**



**“DESARROLLO Y ESTABILIDAD VASCULAR:  
IMPLICANCIAS EN EL SÍNDROME DE  
HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA (OHSS)”**

**Autora: Lic. Leopoldina Scotti**

**Directora: Dra. Fernanda Parborell**

**Directora Adjunta: Dra. Dalhia Abramovich**

**Consejera de Estudios: Dra. Graciela Calabrese**

**Lugar de trabajo: Laboratorio de Fisiopatología Ovárica  
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME-CONICET)**

**2015**

## **RESUMEN**

### **“Desarrollo y estabilidad vascular: Implicancias en el SÍNDROME DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA (OHSS)”**

El Síndrome de Hiperestimulación Ovárica (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 realiza estimulación ovárica. La forma severa es potencialmente mortal y la prevención depende de la detección de marcadores confiables que se manifiesten de manera temprana durante el desarrollo de OHSS. Si bien la causa de OHSS es compleja y en algunos aspectos aún permanece sin estar dilucidada, se sabe que la administración de hCG induce la liberación de mediadores que tienen efecto sobre el sistema vascular, el cual es el responsable de las consecuencias clínicas de OHSS y juega un rol fundamental en el desarrollo de este síndrome. Se ha observado que los niveles séricos del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) aumentan luego de la administración de hCG en mujeres hiperestimuladas con riesgo a desarrollar OHSS. Además, que las concentraciones de VEGF en suero, fluido peritoneal y folicular en estas pacientes correlacionan positivamente con el desarrollo del síndrome. Durante la angiogénesis, además del VEGF, otros sistemas participan en forma activa para lograr la formación de una vasculatura madura y funcional. En base a estos antecedentes, se postularon las siguientes *hipótesis*:

*\* La inhibición del sistema de VEGF o del sistema de Angiopoyetinas (ANGPTs) en el OHSS afecta la angiogénesis ovárica, disminuyendo la permeabilidad vascular que conduce al desarrollo de ascitis y por consiguiente, mejora la función ovárica.*

*\* Los niveles de SIP se encuentran disminuidos en pacientes con riesgo a desarrollar OHSS, siendo en parte responsable de la alta permeabilidad vascular observada en estas pacientes.*

Para llevar a cabo los experimentos del **Capítulo I**, se utilizó un modelo en rata que desarrolla OHSS. Observamos que la inhibición *in vivo* de VEGF ejerce diversas

acciones sobre el ovario de ratas que desarrollaron OHSS. Por un lado, el TRAP (inhibidor de VEGF) disminuyó la concentración sérica de E2 y P4, el porcentaje de cuerpos lúteos y quistes, la proliferación celular, la permeabilidad vascular, el área endotelial y la fosforilación y expresión del receptor de VEGF KDR en ovarios de ratas OHSS. Por otro lado, el TRAP aumentó la apoptosis luteal y la expresión de proteínas de uniones estrechas, claudina-5 y ocludina en el grupo mencionado anteriormente. Además el TRAP no afectó la calidad del endometrio.

Para llevar a cabo los experimentos del *Capítulo II* se utilizaron FF de pacientes control y con riesgo a desarrollar OHSS. Observamos que las pacientes con riesgo a desarrollar OHSS presentan concentraciones aumentadas de ANGPT-1 en FF respecto a pacientes control. Se evaluó el efecto de FF sobre la migración de células endoteliales en presencia de un anticuerpo neutralizante anti ANGPT-1. La incubación de FF de pacientes con riesgo a OHSS en presencia de anticuerpo anti ANGPT-1 resultó en una disminución en la migración celular comparada a la obtenida en ausencia del anticuerpo. Además, observamos que los FF de pacientes con riesgo a OHSS en el cultivo endotelial inducían la remodelación de los filamentos de actina, formando fibras de estrés que entrecruzaban a lo largo del citoplasma de la célula. La preincubación de FF con un anticuerpo neutralizante anti ANGPT-1 revirtió este efecto. El FF de pacientes con OHSS causó un aumento en los niveles de la forma fosforilada de  $\beta$ -catenina y una disminución de los niveles de claudina-5, ZO-1 y VE-caderina en las células endoteliales, comparado a pacientes control. El bloqueo de ANGPT-1 en FF OHSS restauró los niveles de estas proteínas. Por último, observamos que FF de pacientes con riesgo a OHSS aumentaron la actividad angiogénica y la expresión de la integrina  $\alpha v \beta 3$  en las membranas corion alantoideas (CAM) comparado a pacientes controles, y que este efecto se revirtió con el agregado de un anticuerpo anti ANGPT-1.

En el *Capítulo III* determinamos los niveles de esfingosina-1-fosfato (S1P) en FF de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS. Observamos una disminución en los niveles de S1P en FF de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS respecto a pacientes normales. Teniendo en cuenta este resultado, estudiamos el efecto de los FF sobre la expresión del receptor S1P1 en un cultivo de células endoteliales. El agregado de S1P a FF de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS fue capaz de aumentar la expresión del

receptor S1P1 y de disminuir la expresión de la enzima S1P-liasa. Además, el agregado de S1P a FF de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS disminuyó la migración de las células endoteliales a valores inducidos por pacientes control. Además, demostramos que el S1P produjo un aumento rápido de la polimerización de los filamentos de actina formando un anillo de actina cortical, evitando la formación de fibras de estrés observadas en el grupo OHSS. El S1P fue capaz de aumentar la expresión de las proteínas de uniones adherentes VE-caderina, N-caderina y  $\beta$ -catenina en células endoteliales incubadas con de FF OHSS. En el modelo de angiogénesis *in vivo* CAM, el S1P disminuyó las ramificaciones vasculares inducidas por FF de pacientes OHSS y fue capaz de reclutar pericitos al plexo capilar de la CAM.

En conclusión, los resultados de esta Tesis aportan conocimientos para dilucidar la etiología del OHSS como también para detectar biomarcadores (VEGF, ANGPT-1, S1P) que podrían ser utilizados en el futuro para prevenir el desarrollo de este síndrome y por consiguiente, ayudar a los médicos a elegir la mejor estrategia de estimulación ovárica para cada paciente.

**Palabras claves: Ovario; OHSS; angiogénesis, VEGF, ANGPTs; S1P**

# AGRADECIMIENTOS

A **Fer**, por ser la Directora que todos quieren tener. Por haberme elegido nuevamente, enseñarme y guiarme. Por estar siempre dispuesta a hacer hasta lo imposible para que siga creciendo en el mundo de la ciencia. Por ser un ejemplo a seguir. ¡Gracias por continuar confiando en mí!

A **Dalhia**, porque aceptó ser mi Directora Adjunta, y porque sin su ayuda este trabajo no hubiese sido posible. Por transmitirme permanentemente su optimismo y su pasión por la investigación.

A **mis compañeras del laboratorio** que hacen el mejor ambiente de trabajo: **Gri**, porque desinteresadamente dedicó mucho de su tiempo en ayudarme, responder todas mis preguntas y hacerse siempre un lugarcito para enseñarme. Por ser parte importante de este trabajo; **Naty**, por ayudarme muchísimo en la parte experimental de esta Tesis; **Mari, Pau y Cami**, por el día a día y por los buenos consejos para que las cosas siempre me salgan un poco mejor, y a **Diana**, por su asistencia técnica. A **Mariel**, aunque no forme parte de nuestro laboratorio, se hace sentir como una integrante más.

A **Sully**, por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio. Por su predisposición a responder mis preguntas y por darme un consejo siempre que lo necesité.

A **PREGNA Medicina Reproductiva**, por su colaboración en la obtención del material humano. En especial al **Dr. Ignacio de Zúñiga** por su constante interés en la investigación y en nuestro grupo de trabajo.

Al **Dr. Gareth Owen** por haberme recibido en su laboratorio en la Universidad Católica de Chile. Por haberme enseñado todas las técnicas de angiogénesis *in vitro* que se usaron en esta Tesis.

Al **Dr. Luis Haro Durand** por haberme enseñado el ensayo de angiogénesis *in vivo*.

A la ***Dra. Gabriela Meresman*** por su colaboración en la parte del estudio de endometrios.

A la ***Dra. Flavia Saravia y al Lic. Carlos Pomilio*** por su colaboración en la parte del estudio de permeabilidad vascular.

A la ***Dr. Graciela Calabrese*** por cumplir su rol de Consejera de Estudios tan eficientemente.

A ***CONICET*** y a ***PLISSER*** por las becas otorgadas para llevar a cabo el doctorado.

A mis ***amigas de siempre, Agus, Cata, Vicky y Euge***, por compartir juntas cada etapa de la vida y haberme apoyado en estos años. Por permitirme seguir creciendo a su lado.

A ***mi mamá***, por enseñarme el valor del estudio, por dejarme elegir libremente y apoyar cada una de mis decisiones. Por estar siempre orgullosa de mí y sobre todo por haber hecho hasta lo imposible para que llegue a cumplir mis objetivos.

A ***Facu, mi hermano***, por acompañarme siempre. A ***mi papá***, por su confianza en mí.

A ***Pato***, por su amor incondicional y compañía durante estos años. Por darme lo más hermoso de la vida, una hija.

A ***Paulina...***

...posiblemente en este momento no entiendas mis palabras, pero para cuando seas capaz, quiero que te des cuenta de lo que significas para mí. Sos la razón de que me levante cada día esforzándome por el presente y el mañana, sos mi principal motivación. Como en todos mis proyectos, en éste, también estuviste presente...

Los resultados presentados en esta Tesis de Doctorado fueron parte de los siguientes trabajos científicos publicados en revistas internacionales:

***“Inhibition of angiopoietin-1 (ANGPT1) affects vascular integrity in ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS)”*** Leopoldina Scotti, Dalhia Abramovich, Natalia Pascuali, Luis Haro Durand, Griselda Irusta, Ignacio de Zúñiga, Marta Tesone and Fernanda Parborell. **Reprod Fertil Dev. 2014 Nov 11. doi: 10.1071/RD13356. [Epub ahead of print]**

***Local VEGF inhibition prevents ovarian alterations associated with ovarian hyperstimulation syndrome.*** Scotti L, Abramovich D, Pascuali N, Irusta G, Meresman G, Tesone M, Parborell F. **J Steroid Biochem Mol Biol. 2014 Oct; 144 Pt B:392-401. doi: 10.1016/j.jsbmb.2014.08.013. Epub 2014 Aug 23.**

***“Involvement of the ANGPTs/Tie-2 system in Ovarian Hyperstimulation Syndrome (OHSS)”*** Leopoldina Scotti; Dalhia Abramovich; Natalia Pascuali; Ignacio De Zúñiga; Alejandro Oubiña; Laura Kopcow; Soledad Lange; Gareth Owen; Marta Tesone and Fernanda Parborell. **Mol Cell Endocrinol. 2013 Jan 30; 365(2):223-30. doi: 10.1016/j.mce.2012.10.022. Epub 2012 Nov 2.**

# ABREVIATURAS

ANGPT-1: Angiopoyetina-1

ANGPT-2: Angiopoyetina-2

ANGPTs: Angiopoyetinas

CAM: Membrana corionalantoide

CE: Célula endotelial

CGLs: Células de la granulosa-luteínicas

CL: Cuerpo lúteo

E2: Estradiol

FAtr: Folículo atrésico

FF: Fluido folicular

FSH: hormona folículo estimulante

GnRH. Hormona liberadora de gonadotrofinas

hCG: Gonadotrofina coriónica humana

hCGR: Receptor de la gonadotrofina coriónica humana

HDL: Lipoproteína de alta densidad

KDR/VEGFR-2/Flk-1: Receptor de VEGF tipo 2

LH: Hormona luteinizante

ml: mililitro

ng: nanogramo

N-caderina: caderina neural

OHSS: Síndrome de hiperestimulación ovárica



PCOS: Síndrome de Ovario Poliquístico

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PMSG: Gonadotrofina de yegua preñada

p-Tie-2: Receptor de angiopoyetinas fosforilado

P4: Progesterona

Q: quiste

RIA: Radioinmunoensayo

SPK: Esfingosina quinasa

sTie-2: Receptor soluble de angiopoyetinas

S1P: Esfingosina 1-fosfato

S1P1: Receptor de S1P

S1PP: Esfingosina fosfatasa

S1PL: Esfingosina liasa

Tie-2: Receptor de angiopoyetinas

VE-caderina: caderina de endotelio vascular

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular

vW: factor de Von Willebrand

$\alpha$ -SMA:  $\alpha$  -actina de músculo liso

$\mu$ g: microgramo

$\mu$ M: micromolar

$\mu$ l: microlitro

# ÍNDICE

**INTRODUCCIÓN** ----- 16

**EL OVARIO** ----- 17

**Foliculogénesis** ----- 19

*Selección del folículo dominante* ----- 22

*Atresia folicular* ----- 24

**Ovulación** ----- 25

**Luteinización** ----- 26

**Ciclo ovárico de la rata** ----- 27

**ANGIOGÉNESIS** ----- 28

**Mantenimiento de la barrera endotelial y permeabilidad vascular** ----- 30

**Factores angiogénicos** ----- 33

**Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)** ----- 33

**Angiopoyetinas** ----- 37

**Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)** ----- 41

**Esfingosina 1-fosfato (S1P)** ----- 41

*S1P en el ovario* ----- 45

**Ensayos in vitro e in vivo para evaluar angiogénesis** ----- 46

<u>Ensayos in vitro de angiogenesis: Cultivo de células endoteliales</u>	-----	46
<u>Ensayo in vivo de angiogenesis: Ensayo de membrana corionalantoide (CAM)</u>	-----	46
<u>Angiogenesis fisiológica en el ovario</u>	-----	47
<u>Angiogenesis patológica en el ovario</u>	-----	49
<u>SÍNDROME DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA (OHSS)</u>	-----	50
<u>Rasgos clínicos y clasificación de OHSS</u>	-----	51
<u>Etiología de OHSS</u>	-----	52
<u>Incidencia de OHSS</u>	-----	54
<u>Factores de riesgo que influyen en la incidencia</u>	-----	55
<u>Métodos actuales de prevención de OHSS</u>	-----	56
<u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u>	-----	58
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	-----	64
<u>Tratamiento de los animales</u>	-----	65
<u>Radioinmunoensayo (RIA)</u>	-----	66
<u>Morfología ovárica</u>	-----	67
<u>Evaluación de permeabilidad vascular por extravasado de fluoresceína de sodio (NaFlu)</u>	-----	68
<u>Técnica de inmunohistoquímica (IHO) e histoquímica</u>	-----	68

Extracción y medición de proteínas ----- 70

Western blot ----- 70

Análisis histológico de los endometrios ----- 72

Pacientes y obtención de fluido folicular (FF) ----- 72

Neutralización de ANGPT-1 presente en el FF ----- 73

Cultivo primario de células de granulosa-luteínicas humanas (CGLs) ----- 74

Medición de los niveles de ANGPT-1, ANGPT-2 y s-Tie-2 ----- 75

Cultivo de células endoteliales ----- 75

Ensayo de migración por herida ----- 76

Visualización de filamentos de actina ----- 77

Ensayo de angiogénesis in vivo: membrana corionalantoide de embrión de codorniz (CAM) ----- 78

Niveles de integrina  $\alpha\beta 3$  medidos por ELISA ----- 79

Co-localización del factor VW y de  $\alpha$ -actina en el plexo capilar de la CAM por inmunofluorescencia ----- 80

Tratamiento estadístico de los datos ----- 81

**RESULTADOS** ----- 82

**CAPÍTULO I: Efecto de la inhibición in vivo de VEGF en un modelo de OHSS desarrollado en rata** ----- 83

- 1.1. *Medición del peso ovárico y niveles de hormonas esteroideas* ----- 83
- 1.2. *Morfología ovárica* ----- 84
- 1.3. *Efecto de la inhibición de VEGF sobre la luteólisis* ----- 86
- 1.4. *Efecto de la inhibición de VEGF sobre la proliferación celular* ----- 88
- 1.5. *Efecto de la inhibición de VEGF sobre el desarrollo vascular* ----- 90
- 1.6. *Efecto de la inhibición de VEGF sobre la expresión de sus receptores y la expresión de pAKT/AKT* ----- 91
- 1.7. *Evaluación de la Permeabilidad vascular en ovario* ----- 93
- 1.8. *Efecto de la inhibición de VEGF sobre la expresión de proteínas de uniones estrechas: claudina-5 y ocludina* ----- 95
- 1.9. *Efecto de la inhibición de VEGF sobre la histología y la proliferación endometrial* ----- 96

**CAPÍTULO II: Efecto de la inhibición de ANGPT-1 en OHSS** ----- 99

- 1. *Niveles de los miembros del sistema de ANGPTs/Tie en un modelo de OHSS desarrollado en roedor* ----- 99
- 2. *Análisis de la expresión de los miembros del sistema de ANGPTs/Tie en FF y en CGLs de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS* ----- 100
  - 2.1. *Características de las pacientes* ----- 100
  - 2.2. *Niveles de ANGPT-1 y el receptor soluble Tie-2 en FF de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS* ----- 101
  - 2.3. *Niveles de ANGPT-1 y -2 en CGLs de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS* ----- 104
- 3. *Efecto de los FF provenientes de pacientes sometidas a ART con riesgo a desarrollar OHSS incubados con un inhibidor de ANGPT-1 en una línea humana de células endoteliales* ----- 106

- 3.1. *Efecto de los FF incubados con un anticuerpo neutralizante anti ANGPT-1 sobre la migración de células endoteliales* ----- 106
- 3.2. *Efecto de los FF incubados con un anticuerpo neutralizante anti ANGPT-1 sobre la integridad del citoesqueleto de actina de células endoteliales* ----- 108
- 3.3. *Efecto de los FF incubados con un anticuerpo neutralizante anti ANGPT-1 sobre la expresión de proteínas de uniones intercelulares en células endoteliales en presencia de FF de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS* ----- 110
4. *Efecto de FF incubados con un inhibidor de ANGPT-1 en un modelo de angiogénesis in-vivo (CAM, membrana corioalantoidea de embrión de codorniz japónica)* ----- 112

**CAPÍTULO III: Participación del esfingolípido S1P en el desarrollo de**

**OHSS** ----- 115

1. **Niveles de S1P en FF de pacientes OHSS** ----- 115
2. **Efecto de los FF provenientes de pacientes sometidas a ART con riesgo a desarrollar OHSS incubados en presencia de S1P en una línea humana de células endoteliales** ----- 116
- 2.1. *Niveles del receptor S1P1 en células endoteliales incubadas con FF de pacientes control y con riesgo a OHSS en presencia de S1P* ----- 116
- 2.2. *Niveles de la enzima S1P-liasa (SPL) en células endoteliales incubadas con FF de pacientes control y con riesgo a OHSS en presencia de S1P* ----- 117

2.3. *Efecto de los FF de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS incubados en presencia de S1P sobre la migración de células endoteliales* ----- 119

2.4. *Efecto de los FF de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS incubados en presencia de S1P sobre la integridad del citoesqueleto de actina en células endoteliales* ----- 121

2.5. *Efecto de los FF de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS incubados en presencia de S1P sobre la expresión de proteínas de uniones adherentes en células endoteliales* ----- 123

2.6. *Niveles de S1P en células endoteliales inducidas con hCG* ----- 127

3. **Efecto de los FF provenientes de pacientes sometidas a ART con riesgo a desarrollar OHSS incubados en presencia de S1P sobre la vasculatura de la CAM** ----- 128

**DISCUSIÓN** ----- 131

**CONCLUSIÓN GENERAL** ----- 151

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS** ----- 154

# INTRODUCCIÓN

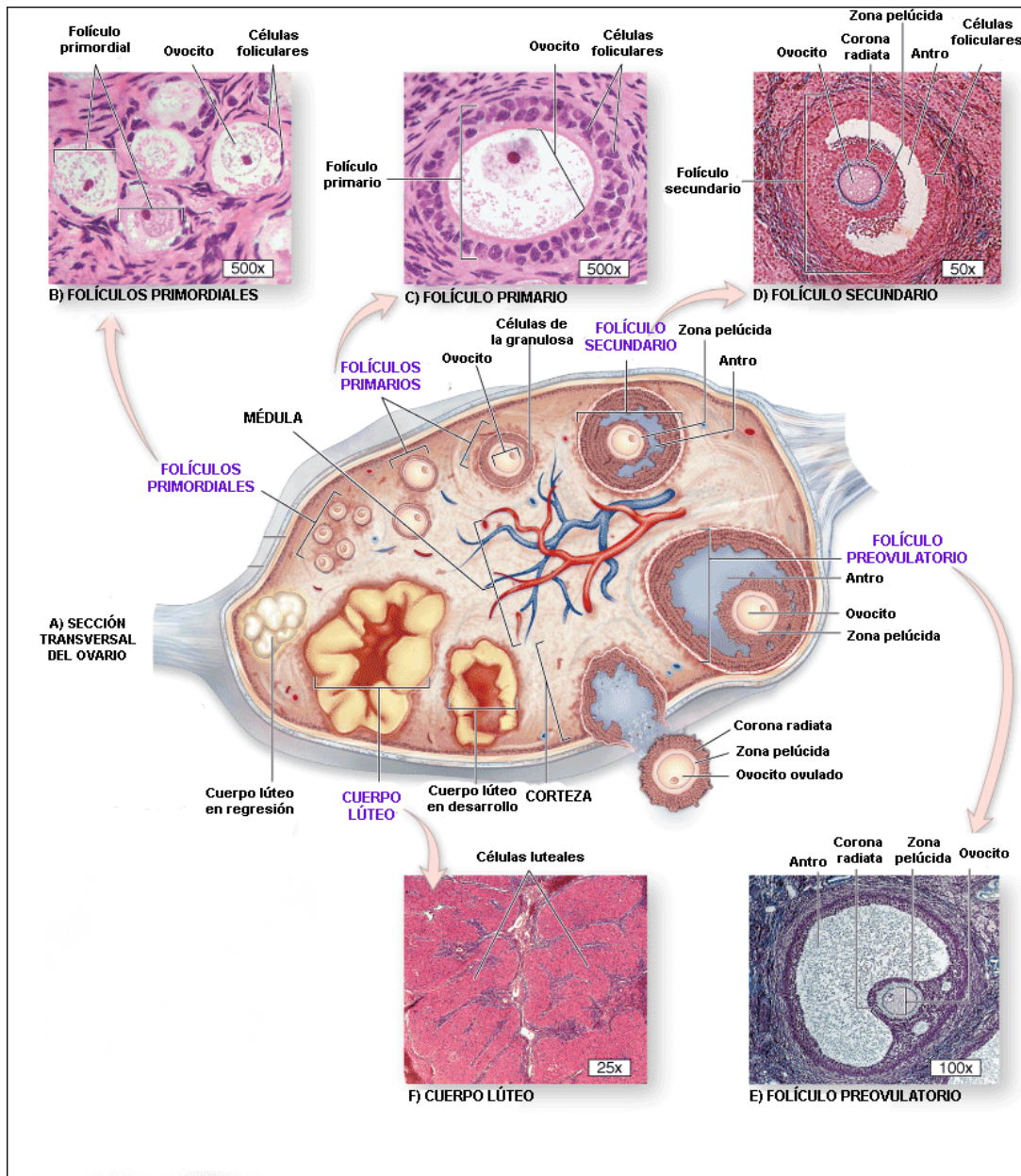


## EL OVARIO

El ovario de mamíferos es un órgano que tiene como principal función la de generar, almacenar, desarrollar y liberar los ovocitos formados durante la vida embrionaria o fetal, como gametas completamente competentes para ser fertilizadas y para permitir el desarrollo embrionario (*función gametogénica*). Es además el principal portador de las células secretoras de hormonas femeninas que desarrollan y mantienen los caracteres sexuales secundarios de la hembra y preparan a los órganos reproductivos accesorios para la preñez y el nacimiento de la cría, generando un ambiente propicio para la implantación y desarrollo del cigoto (*función endocrina*) [1]. La función final del ovario es la de permitir la propagación de la especie [2].

Durante la adultez la superficie del ovario es nodular y se encuentra cubierta por una capa monoestratificada de células cúbicas o poliédricas, llamada epitelio germinal [3]. Esta cubierta epitelial está frecuentemente invaginada hacia el tejido conectivo subyacente llamado túnica albugínea, formando pequeños pliegues, hoyos o criptas. Por debajo se encuentran dos zonas: la llamada zona cortical y la zona medular, y el límite entre ambas no se encuentra bien definido. La primera comprende al estroma ovárico (formado por tejido conectivo laxo, fibroblastos y precursores de células tecales), y folículos en distintos estadios de maduración, atrésicos y cuerpos lúteos. La zona medular que se encuentra muy vascularizada e innervada, contiene células de tipo muscular y tejido conectivo laxo [4] (**Fig. 1A**).

El ovario de mamíferos es, por lo tanto, un órgano heterogéneo en cuanto a la población celular presente en un momento dado, y también lo es en el tiempo, a lo largo de la vida del individuo. A partir de la pubertad, se producen variaciones hormonales cíclicas que afectarán tanto al ovario como al cuerpo lúteo y útero, preparándolos para la expulsión del ovocito y la potencial implantación del blastocisto.



**Figura 1: Estructura del ovario, desarrollo folicular, ovulación y formación del cuerpo lúteo.** A) Diagrama de una sección de ovario que muestra los diferentes estadios de la maduración folicular, ovulación y formación del cuerpo lúteo. Todas las etapas y estructuras que se muestran en este esquema suceden en diferentes tiempos durante el ciclo ovárico y no ocurren en simultáneo. Las secciones histológicas muestran B) folículos primordiales, C) un folículo primario, D) un folículo secundario, y E) un folículo preovulatorio. Luego de la ovulación, el folículo remanente, forma el cuerpo lúteo F). Adaptado de McGraw Hill Companies [5].

## **Foliculogénesis**

El proceso de foliculogénesis comprende el crecimiento del folículo y su pasaje a través de los distintos estadios de desarrollo, desde el momento en que emerge del pool de folículos formado durante la ovogénesis, hasta el momento en el cual es ovulado o entra en atresia (regresión o muerte del folículo). Este proceso es llevado a cabo en la corteza del ovario (**Fig. 1**).

Debido al continuo crecimiento y a la regresión de los folículos, la relación volumen/contenido del ovario, se encuentra en constante cambio [1]. Los ovarios de los mamíferos contienen a los folículos como unidades funcionales. Para cada especie se encuentran diferencias en el número de folículos formados durante la ovogénesis. Al nacimiento, el ovario contiene alrededor de 20.000, 160.000, y 1.000.000 folículos en ratas, ovejas y humanos respectivamente [1]. En la mayoría de los mamíferos antes o luego del nacimiento, las ovogonias son transformadas en ovocitos primarios. Esta transición de ovogonia a ovocito está determinada por el cese del proceso de mitosis que sufren las células primordiales germinales y la entrada en la fase meiótica: profase, en la cual los ovocitos quedan arrestados. Luego de este proceso, los ovocitos se rodean de una capa única de células foliculares aplanadas, llamadas pregranulosa. En esta fase, las superficies del ovocito y de las células foliculares envolventes son lisas y están en estrecho contacto. Las células de la pregranulosa se encuentran envueltas en la llamada lámina basal que separa a este tipo celular de todo elemento que la rodea, entre ellos vasos sanguíneos, capilares y nervios [6].

Los folículos primordiales (**Fig. 1B**), se encuentran principalmente en la periferia de la corteza, inmediatamente por debajo de la túnica albugínea y constituyen la reserva de folículos en reposo, los cuales serán progresivamente eliminados durante la vida reproductiva. Aparecen en el humano aproximadamente en la semana 16 de embarazo y su formación terminaría aproximadamente en la semana sexta luego del nacimiento [7]. Para que estos folículos primordiales inicien su crecimiento, es necesaria una compleja interacción entre factores estimulatorios e inhibitorios.

Estos folículos continuamente abandonan el reservorio para convertirse en folículos primarios (**Fig. 1C**). Esta transición implica ciertas modificaciones citológicas en el ovocito, en las células foliculares y en el tejido conjuntivo adyacente. A medida que el ovocito aumenta de tamaño, la capa única de células aplanadas se convierte inicialmente en una capa de células cúbicas y cilíndricas la cual, mediante el proceso de mitosis, origina las células de granulosa que formarán posteriormente un epitelio estratificado. Entre el ovocito y las células de granulosa circundantes, se originan espacios donde se deposita una sustancia que representa el inicio de la zona pelúcida, mucopolisacáridos secretados por las células de la granulosa, que más tarde originarán un halo translúcido que rodea al ovocito. La zona pelúcida está formada por tres glicoproteínas y su adquisición es una característica del folículo preantral primario. Se sabe que ratones deficientes de proteínas que componen la zona pelúcida son infértiles o subfértiles [8].

A medida que los folículos aumentan de tamaño, van desplazándose gradualmente hacia el interior de la corteza. A través de sucesivas divisiones mitóticas de las células de granulosa, el folículo primario unilaminar pasa a un estadio preantral, multilaminado (con dos o más capas de células de la granulosa rodeando al ovocito), denominado folículo secundario o folículo preantral (**Fig. 1D**). Estos folículos poseen una o dos arteriolas que terminan en una red vascular fuera de la lámina basal, y por lo tanto, el folículo entra en contacto directo con factores que se encuentran en la circulación [9]. En este estadio las células de la granulosa conforman una población homogénea y adquieren receptores de alta afinidad para la hormona folículo estimulante (FSH) y hormonas esteroideas [10]. Recientemente se ha reportado la importancia de un factor derivado del ovocito llamado GDF-9 (Factor Diferenciador del Crecimiento-9), el cual, junto con la hormona FSH regularían el desarrollo folicular y la atresia durante la transición del estadio preantral a antral temprano [11]. Por lo tanto la presencia del receptor de FSH en este estadio folicular, sería necesario para su posterior desarrollo. Simultáneamente con la proliferación de estas células, se desarrolla alrededor del folículo otra capa de células originadas del estroma que forma la teca folicular. La aparición del estrato tecal se asocia con la adquisición de la vascularización del folículo. A medida que se forman los capilares, las células teca-intersticiales parecen comenzar la

diferenciación con la adquisición de los receptores de LH (Hormona Luteinizante) y la capacidad de biosíntesis de esteroides. La capa tecal se diferencia en una interna y otra externa, la cual está compuesta principalmente por tejido conectivo. Numerosos vasos pequeños penetran en la teca externa para proporcionar un rico plexo capilar a la teca interna y dado que los capilares no penetran la membrana basal, la capa de células de granulosa permanece avascular durante todo el crecimiento del folículo. Como consecuencia de este aumento de la vascularidad, el folículo aumenta su exposición a factores que circulan por la sangre [12].

Es interesante destacar que el establecimiento de la red de capilares coincide con un periodo de crecimiento y diferenciación del folículo [13]. Al aumentar el folículo de tamaño, se termina de formar la zona pelúcida. Las células de la granulosa mantienen contacto con el ovocito a través de proyecciones citoplasmáticas que penetran en la zona pelúcida y establecen contacto con la membrana celular del ovocito. Al final de esta fase denominada preantral, el ovocito detiene su crecimiento y se vuelve competente para reanudar la meiosis. Cuando el folículo alcanza un diámetro aproximado de 0,2 mm y posee de seis a doce capas de células (en humanos), aparecen unos espacios irregulares, llenos de un líquido claro entre las células de la granulosa. Este líquido aumenta en cantidad a medida que crece el folículo y los espacios irregulares que se forman entre las células de la granulosa confluyen para constituir una sola cavidad denominada antro.

Con la aparición de la cavidad antral, el folículo se convierte en folículo terciario o folículo antral, y esta fase se denomina fase antral. Se forma, entonces, una cavidad central: el antro folicular, rodeado de células de la granulosa murales, localizadas en la periferia, conteniendo en el interior el fluido folicular. El folículo antral está tapizado por un epitelio estratificado de células granulosas que presentan un engrosamiento localizado en uno de sus lados llamado células del cúmulus, las que se encuentran unidas entre sí y al ovocito mediante uniones estrechas (gap). La relación con estas células se vuelve más laxa debido a la gradual aparición del líquido que llena los espacios intercelulares. Al desprenderse el ovocito, una o más capas de las células del cúmulus, permanecen unidas a él, formando la corona radiata, envoltura celular laxa que persiste alrededor del ovocito aún después de la ovulación.

La aparición de los receptores de LH en las células de la granulosa ocurre durante la transición del folículo antral hacia el folículo preovulatorio, debido a la estimulación de FSH [14]. Este paso es fundamental para que el folículo progrese hacia el paso final, la ovulación.

Los folículos preovulatorios (*Fig. 1E*) son aquellos que han alcanzado los estadios finales de crecimiento y maduración del folículo antral y han adquirido la habilidad para ovular ante los adecuados niveles de gonadotropina LH o la administración de hCG. Es interesante destacar que los receptores a LH no se encuentran expresados de forma homogénea en estos folículos, sino que los mismos presentan un gradiente de expresión que disminuye desde las capas externas de la granulosa hacia la células del cúmulus [14;15]. El caso más extremo es el de las células del cúmulus de ratón, donde los receptores a LH son indetectables [16]. Por esta razón, el reinicio de la meiosis inducida por LH y la expansión de las células del cúmulus requeridas para la ovulación, serían eventos mediados por las células de la granulosa murales [17;18].

Por otra parte, los folículos preovulatorios se caracterizan por una baja tasa mitótica de las células foliculares y una alta relación estrógenos/andrógenos y estrógenos/progesterona en el fluido folicular.

Desde el momento en que el folículo ha sido seleccionado para la ovulación, el mismo comienza a crecer notablemente en tamaño. Las células de la granulosa sufren transformaciones morfológicas como ser el aumento de su volumen [19]. A este folículo destinado a ovular, se lo denomina folículo dominante [20].

### ***Selección del folículo dominante***

El reclutamiento cíclico y selección de los folículos representa un proceso continuo, que eventualmente llega a la formación de uno o más folículos preovulatorios, cuyo número varía en cada especie. En los primeros días del ciclo menstrual en la mujer, aumentan los niveles circulantes de FSH, como consecuencia, una cohorte de

folículos antrales escapa de la apoptosis que los llevaría a la atresia folicular. Dentro de este grupo, alrededor de 10 folículos antrales crecen más rápido y producen altos niveles de estrógenos e inhibina, seleccionándose entre éstos el folículo dominante.

A pesar de que no se conoce exactamente por qué un folículo emerge como dominante, se postula que éste posee una mayor sensibilidad a FSH, debido a una mayor expresión de receptores de FSH y/o LH. Asociado a este proceso, el estradiol y los factores de crecimiento locales ejercen un efecto permisivo, amplificando la acción de la FSH en los folículos que están madurando. Sin embargo, el aumento de estradiol e inhibina, también ejerce una retroalimentación negativa sobre la liberación de FSH a nivel hipotálamo-hipófisis, lo cual evita que otros folículos sigan desarrollándose [2;21].

Además, la disminución de FSH provocaría un descenso de la actividad de la aromatasas dependiente de FSH (que es la que transforma andrógenos a estrógenos) lo que limita, como consecuencia, la disponibilidad de estrógenos en los folículos menos maduros. Esto llevaría a la disminución de la proliferación de las células de granulosa y al aumento de andrógenos, provocando una atresia irreversible.

El folículo dominante debe retener una sensibilidad única a la FSH y de esa manera aumentar la proliferación de sus células de granulosa, logrando así tener una mayor cantidad de receptores para esta gonadotropina. Los folículos seleccionados tendrán de esta manera un aumento de estrógenos mucho mayor que los folículos restantes. Además, estos folículos seleccionados tendrán una mayor cantidad de células de granulosa y una mayor vasculatura tecal, permitiendo una entrada preferencial de FSH. Por lo tanto, los folículos dominantes no sólo tienen la ventaja de tener mayor número de receptores para FSH sino que además poseen una gran vasculatura que permite un fácil acceso para esta hormona.

En la rata, bajo el estímulo de FSH y en presencia de estrógenos, las células expresan receptores para LH y prolactina, los cuales van aumentando hasta llegar a valores máximos antes de la ovulación [22;23]. El aumento de estrógenos provoca, por un mecanismo de retroalimentación positiva, la estimulación del pico preovulatorio de

LH. Estos procesos, actuando en forma sincronizada, permitirían la selección de los folículos dominantes hasta llegar a la ovulación [2].

Por otro lado, se ha postulado, que el folículo dominante produce factores atretogénicos que inhiben el desarrollo de los folículos vecinos o subordinados [2;24].

### *Atresia folicular*

La atresia folicular es uno de los mecanismos característicos en vertebrados mamíferos y no mamíferos. En humanos, se calcula que más del 99% de los folículos sufren cambios degenerativos durante el normal funcionamiento ovárico. El proceso por el cual los folículos son eliminados se denomina atresia. Este fenómeno ocurre por la apoptosis de las células de granulosa y del ovocito. La atresia folicular podría significar una ventaja evolutiva, siendo seleccionados aquellos folículos que contengan ovocitos saludables para que puedan llegar exitosamente a ser ovulados. Esta selección será posible durante un ciclo reproductivo si los folículos son expuestos a FSH en un estadio crítico de desarrollo, como fue mencionado anteriormente.

El tipo celular que evidencia el proceso de apoptosis más claramente es el de las células de granulosa. Sin embargo, en algunas especies como cerdos, pollo y rata, se ha observado la ocurrencia de este proceso en las células de la teca, aunque de forma más tardía [25;26].

Existen diversos factores atretogénicos en ovario y también, factores que favorecen la supervivencia celular. Dentro de los primeros podemos mencionar GnRH-I, IL-6, andrógenos, TNF- $\alpha$ , FasL, etc [27-29]. Como factores citoprotectores ováricos encontramos el Factor de Crecimiento Epidermal (EGF), el Factor de Crecimiento similar a Insulina tipo 1 (IGF-1) y el Factor Transformante tipo  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). También las hormonas esteroideas son factores supresores o estimulantes de la apoptosis dependiendo del tejido en el que actúan. Por ejemplo, los glucocorticoides estimulan la apoptosis en el timo pero no en testículo [30] y los estrógenos, inhiben la apoptosis en



ovario [31]. Cabe destacar que la relación andrógenos/estrógenos es elevada en fluido folicular de folículos atrésicos [32].

Las gonadotrofinas son consideradas como los principales factores de supervivencia folicular. Se ha demostrado que los folículos atrésicos tempranos son rescatados por la administración exógena de gonadotrofinas [33] y que la administración de FSH en ratas hipofisectomizadas inmaduras disminuye la apoptosis folicular en células de la granulosa [34].

Estos son solo algunos ejemplos de los múltiples factores que regulan el proceso de atresia folicular. El destino final de los folículos (crecimiento/ovulación o atresia) depende del delicado balance entre la expresión y acción de factores que promueven la proliferación, el desarrollo y la diferenciación de las células del folículo ovárico y de aquellos que promueven la apoptosis de las mismas llevando al folículo a la atresia.

### **Ovulación**

A medida que se acerca la mitad del ciclo, hay un ascenso notable de estrógenos por sobre el umbral, estimulando, por un mecanismo de retroalimentación positiva, un pico de gonadotrofinas, principalmente de LH y en menor medida de FSH. Junto a circunstancias únicas del microambiente, el pico de LH es el gatillo para que el folículo dominante ovule y origine un cuerpo lúteo en cada ciclo menstrual en humanos (éste no es único en el ciclo estral de roedores y otros mamíferos).

Luego del pico preovulatorio de LH, la síntesis de estradiol declina considerablemente, mientras que se produce un aumento notable en la producción de progesterona estimulada por la misma LH [35]. Las células de la granulosa cercanas a la lámina basal, comienzan a soltarse debido a la desaparición de las uniones estrechas (gap) que las mantenían unidas. El único sitio donde estas uniones no se ven alteradas, es en aquellas células que están formando parte de la corona radiata.

También en este proceso existe un componente mecánico dado por el rápido aumento del tamaño folicular, luego del cual el folículo ovárico emerge desde la corteza ovárica. Otro prerrequisito para la ruptura folicular es la digestión proteolítica de la pared folicular, y se sabe que se activan colagenasas para la disolución de la membrana basal y el tejido tecal asociado a la ovulación. Las prostaglandinas de la serie E y F (PGE y PGF<sub>2α</sub>) son algunos de los componentes involucrados en la degradación de la pared folicular [36].

Luego de la ovulación, el folículo ovárico se transforma en cuerpo lúteo y en este proceso se encuentran involucrados una gran cantidad de genes. Además, el ovocito que estaba detenido en profase I, reanuda la meiosis y es ovulado en el estadio de metafase II.

### **Luteinización**

El cuerpo lúteo es un órgano endocrino transitorio formado por las células foliculares remanentes del folículo que ha sido ovulado (**Fig. 1F**). Su principal función es la de secretar progesterona, la cual tiene numerosas funciones, entre ellas, la preparación del útero para el período de preñez o embarazo y la regulación de las contracciones del oviducto para el transporte del óvulo al útero. Por lo tanto, la formación del cuerpo lúteo en mamíferos, se considera un evento esencial para la supervivencia e implantación del embrión. Este proceso se inicia mediante numerosos cambios bioquímicos y morfológicos que sufren las células de la teca interna y las células de la granulosa de los folículos preovulatorios. Estos cambios que determinan el proceso de *luteinización*, se producen como consecuencia del incremento en los niveles séricos de LH (Hormona Luteinizante), asociado al pico preovulatorio de esta hormona.

No todas las células se diferencian sincrónicamente luego de la ovulación. Es decir que las células del cuerpo lúteo derivan de los dos tipos de células foliculares secretoras de esteroides, de la granulosa y teca. Por lo tanto, en primates, esta glándula consiste en al menos, dos tipos de *células luteales*: *las células granulosa-luteínicas* y *las células teca-luteínicas* (llamadas grandes o pequeñas en roedores). Las

primeras derivan de la granulosa y contienen todos los elementos de las células secretoras de esteroides como numerosas mitocondrias y abundante retículo endoplasmático liso. Por el contrario, las células teca-luteínicas o pequeñas provienen de la teca y tienen moderada cantidad de mitocondrias pero abundante retículo endoplasmático liso. Ambos tipos celulares constituyen el 50 % del cuerpo lúteo, ya que éste contiene además abundantes elementos del tejido conectivo.

El establecimiento de un cuerpo lúteo funcional, en los días siguientes a la ovulación, implica cambios morfológicos como los que ya hemos descripto, y además una rápida vascularización de las capas celulares que se originan de la granulosa y de la teca, fenómeno inducido probablemente por la ruptura de la membrana basal que separa a los dos tipos celulares. Estudios recientes, han demostrado que el factor VEGF cumple un rol importante en el desarrollo y mantenimiento de un cuerpo lúteo funcional [37].

El control de la secreción de progesterona en roedores es llevado a cabo por las hormonas LH, prolactina (ambas luteotróficas) y la sustancia luteolítica, prostaglandina  $F_{2\alpha}$  (PGF  $_{2\alpha}$ ). En la mujer, es la LH (y hCG durante el embarazo) las principales hormonas reguladoras del cuerpo lúteo. En ausencia de embarazo o preñez al final de cada ciclo ovárico, o cuando ya no es requerido para el mantenimiento de la placenta, el cuerpo lúteo deja de producir progesterona y regresa en un proceso denominado *Luteólisis*. Se ha demostrado que la muerte celular programada o apoptosis está asociada a este proceso [38-40].

### **Ciclo ovárico de la rata**

El término *estro* fue utilizado por primera vez por Heape en el año 1900 para describir el período durante el cual la hembra está dispuesta a recibir al macho en coito fecundante. El período anterior al estro, lo denominó *proestro* y se caracteriza por el momento en el cual el animal entra en celo. En ausencia de concepción, el estro es seguido por el *metaestro*, también conocido como *diestro I*. El período siguiente, *diestro II*, varía en duración de acuerdo a las especies y es el tiempo durante el cual la secreción

ovárica prepara a los tejidos reproductivos para la recepción del óvulo fertilizado luego del coito en el estró. En la rata dura uno o dos días determinando que el ciclo estral tenga una duración de 4 o 5 días. Si la fertilización no ocurre, el animal vuelve al período de proestro y un nuevo ciclo se inicia.

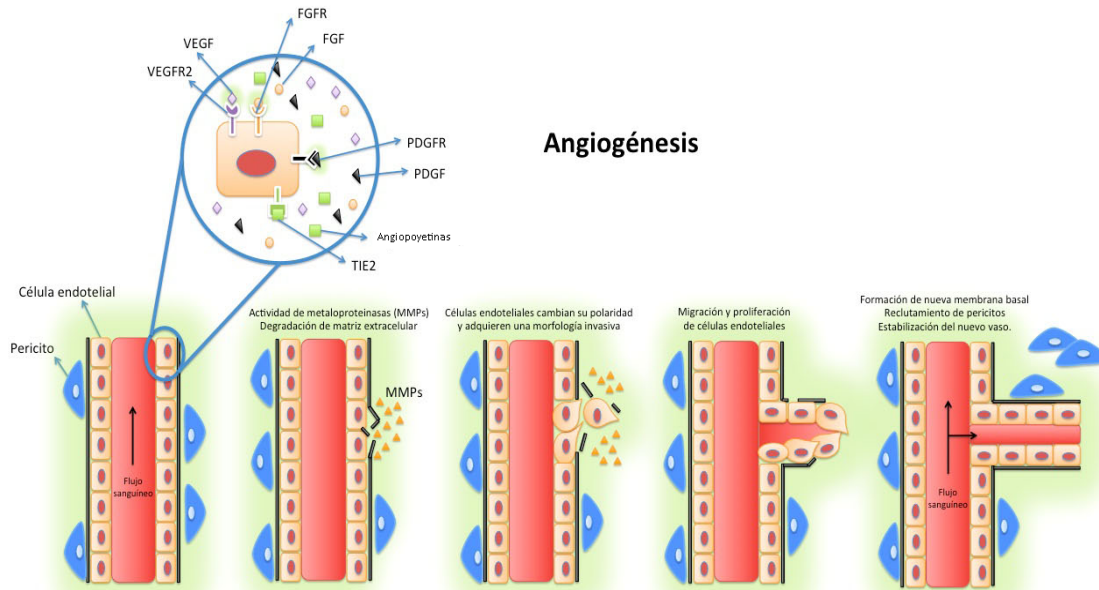
A nivel vaginal se pueden determinar los distintos estadios del ciclo por observación con microscopio según los tipos celulares presentes en el extendido. En el proestro predominan células escamosas mientras que en el diestro I y II los mayoritarios son los leucocitos.

La rata de laboratorio es un mamífero no estacional, de ovulación espontánea y poliéstrico. Es decir, el ciclo ovárico ocurre durante todo el año y la ovulación no depende del estímulo de la cópula. Por dichas características, sumadas a su fácil reproducción y mantenimiento en el bioterio, podemos afirmar que la rata de laboratorio representa un buen modelo para el estudio de la fisiología ovárica gonadal.

### **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 [41]. La angiogénesis, que ocurre en el adulto, es el proceso por el cual se forman vasos sanguíneos nuevos a partir de vasculatura preexistente [42]. Esta vasculatura es modificada mediante el brote y el 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 forman 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 [43] (*Fig. 2*).



**Figura 2. Descripción de las distintas etapas del proceso angiogénico.** *La angiogénesis es un proceso finamente regulado por la interacción de diversos factores, entre ellos VEGF, FGF, PDGF y angiopoietinas. Consta de una serie de pasos: activación de células endoteliales; degradación de la matriz extracelular que rodea al vaso existente por metaloproteinasas; migración de las células endoteliales hacia el espacio intersticial; proliferación de células endoteliales; formación del lumen y de una nueva membrana basal; reclutamiento de pericitos y estabilización de los vasos recientemente formados [44].*

Los pericitos son células perivasculares que se asocian a las células endoteliales y a la microvasculatura. Expresan  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), que es un marcador específico para este tipo celular [45;46]. Estructuralmente, son células individuales distribuidas a lo largo de los vasos capilares que se caracterizan por tener un cuerpo celular que se inserta en la membrana basal y que protruye por sobre la pared del capilar [47].

La angiogénesis ha sido ampliamente estudiada en condiciones patológicas, principalmente debido a que está aumentada en cáncer y otras enfermedades [48]. 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 [49]. 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.) [49;50], como a una disminución en la angiogénesis normal (retraso en cicatrización de heridas, úlceras varicosas crónicas, falta de cicatrización de fracturas) [50]. Sin embargo, se observa angiogénesis fisiológica en el tracto reproductor femenino, como por ejemplo en la placenta, la implantación y los cambios cíclicos que ocurren en ovario y endometrio [51]. Los tejidos del sistema reproductor femenino adulto presentan una alta tasa mitogénica solo comparable al crecimiento tumoral [52]. 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 [52].

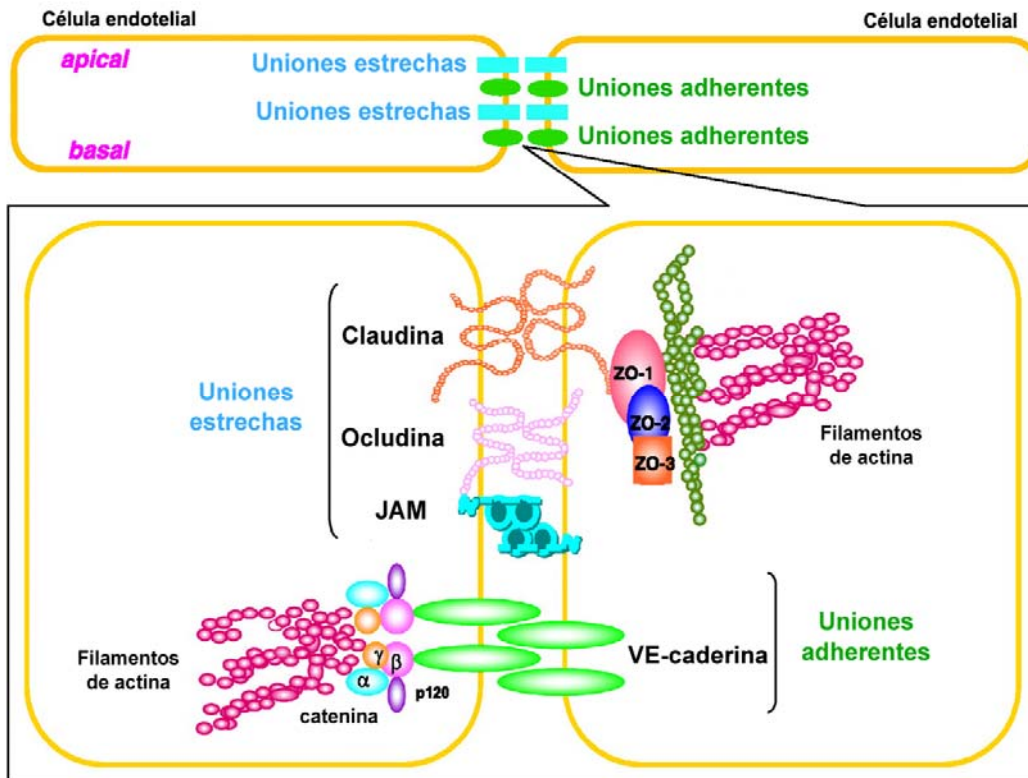
### **Mantenimiento de la barrera endotelial y permeabilidad vascular.**

El endotelio vascular es un tejido biológicamente complejo que forma una barrera semipermeable entre el compartimento del fluido intravascular y el intersticio de varios órganos. Por lo tanto, la integridad del endotelio es esencial para la homeostasis y el normal funcionamiento de los órganos.

La permeabilidad vascular comprende 2 mecanismos: paracelular y transcelular. El primero consiste en la apertura y cierre de las uniones endoteliales mientras el segundo incluye el transporte mediado por vesículas y transportadores [53]. La fragilidad vascular se puede deber a una alteración en la organización de las uniones intercelulares y/o a una falta de interacción de las células endoteliales con los pericitos o con las proteínas de la matriz extracelular [54].

Las células endoteliales presentan dos tipos de uniones especializadas, las uniones estrechas y las uniones adherentes. Ambos tipos de uniones cumplen funciones diferentes. Por un lado, las uniones estrechas regulan el paso de iones y solutos a través de la ruta paracelular [55;56]. Por otro lado, las uniones adherentes median contactos célula-célula y promueven su maduración y mantenimiento. La adhesión entre células está mediada por proteínas transmembrana que promueven la interacción homofílica. El dominio citoplasmático de estas proteínas transmembrana une a proteínas adaptadoras las cuales a su vez anclan el complejo de adhesión al citoesqueleto [57]. Existen diferentes tipos de proteínas transmembrana en las uniones estrechas, como la ocludina, y varios miembros de la familia de las claudinas, siendo la Claudina-5 específica de células endoteliales [58;59]. Entre las principales proteínas adaptadoras podemos nombrar a miembros de la familia ZO, como ZO-1 y ZO-2 en endotelio (**Fig. 3**).

Una de las principales proteínas transmembrana de las uniones adherentes es la caderina endotelial vascular (VE-caderina) La VE-caderina se une a las cateninas, particularmente a  $\beta$ -catenina, p120 y plakoglobina [55;60-62] (**Fig. 3**).



**Figura 3 Esquema de la arquitectura molecular de las uniones intercelulares entre células endoteliales.** Las uniones del tipo estrechas y adherentes sellan el espacio paracelular entre células. En las uniones estrechas se encuentran tres tipos de proteínas de la membrana: ocludina, claudina, y JAM. Están vinculadas con el citoesqueleto actina a través de las proteínas ZO-1, ZO-2, y ZO-3. La VE-caderina, que interactúa de manera homofílica, se localiza en las uniones adherentes.  $\beta$ -catenina, que se une a la VE-caderina, interactúa con  $\alpha$ -catenina, que se asocia con el citoesqueleto de actina. Además, p120 y plakoglobin/ $\gamma$ -catenina se asocian con la VE-caderina. Adaptado de Hirase T. y col. (2012) [63]

A través de sus dominios citoplasmáticos, las proteínas de adhesión de ambos tipos de uniones se unen también a proteínas del citoesqueleto y de señalización que promueven anclaje de las uniones a los filamentos de actina y transfieren señales en el interior de la célula. Esta asociación con el citoesqueleto se requiere para la estabilización de las uniones, pero también para la regulación dinámica de apertura y



cierre de las uniones. La interacción de las proteínas de adhesión de unión con el citoesqueleto de actina también es relevante en el mantenimiento de la forma celular y la polaridad [64].

Cabe resaltar que existe otro sistema denominado nectina-afadina que colabora con las uniones estrechas y adherentes en la regulación de la permeabilidad vascular [65]. Las nectinas comprenden al menos 4 miembros (nectina-1-4) [66]. Estas proteínas se asocian al citoesqueleto de actina a través de la afadina. En ovario, Herr y col. (2013) demostraron que la VE-caderina, nectin-2 y la claudina-5 regulan la permeabilidad vascular en forma coordinada en el cuerpo lúteo humano [67]. Existe una estrecha relación entre el control de la integridad y la permeabilidad vascular. En muchos casos, la apertura y el cierre de las uniones endoteliales es transitoria y la permeabilidad vascular se revierte en un tiempo relativamente corto. Sin embargo, en algunas condiciones patológicas, la pérdida de las uniones puede inducir cambios irreversibles en la integridad vascular.

### **Factores angiogénicos**

#### **Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)**

El VEGF-A o VEGF es un potente factor mitogénico y estimulante de la migración de las células endoteliales. También participa en el mantenimiento estructural y aumenta la permeabilidad de capilares y vénulas [47].

La molécula es una glicoproteína homodimérica básica, de 45 KDa, que se une a receptores específicos en las células endoteliales. Este factor pertenece a una familia de proteínas compuesta por VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, y el factor de crecimiento placentario (PlGF) [43].

La importancia del VEGF en la angiogénesis fue demostrada en ratones donde, la delección de al menos un alelo del gen es letal durante el desarrollo fetal debido a una disrupción en la angiogénesis embrionaria [68;69], mientras que su sobreexpresión

también induce la muerte fetal por hipervascularización y anomalías cardíacas [70]. Existe amplia evidencia de que el VEGF-A, además de su función angiogénica, es un factor de supervivencia para células endoteliales tanto *in vivo* como *in vitro*, ya que induce la expresión de las proteínas antiapoptóticas BCL2, survivina y XIAP y activa la vía de señalización de PI3K/Akt [71-74]. El VEGF-B juega un papel en el crecimiento y vascularización coronaria, mientras que el VEGF-C es importante en la regulación del desarrollo de los vasos linfáticos. VEGF-D jugaría un rol tanto en angiogénesis como en el desarrollo de vasos linfáticos.

La expresión de VEGF está estrictamente regulada en todos los tejidos, debido a que un déficit o una sobreexpresión de esta molécula causarían diversas patologías. Esta regulación se da a través de diferentes mecanismos y factores, siendo uno de los principales, la tensión de oxígeno. Se ha demostrado que la expresión del ARNm para VEGF es inducida bajo condiciones de hipoxia ocasionadas en diversas situaciones fisiológicas o patológicas [75]. Otros inductores de la expresión de VEGF son factores de crecimiento, como EGF, FGF, los factores de crecimiento transformantes  $\alpha$  y  $\beta$  (TGF $\alpha$  y TGF $\beta$ ) y el factor de crecimiento similar a insulina-1 (IGF-1) [76], lo que sugiere que la liberación autócrina o parácrina de estos factores coopera con la hipoxia local en la regulación de VEGF en el microambiente. Además, algunas citoquinas inflamatorias como la interleukina 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ) y la IL6 también son capaces de inducir la expresión de VEGF en distintos tipos celulares [77;78].

Las hormonas también son importantes reguladoras de la expresión del gen de VEGF. Se ha demostrado que TSH y ACTH inducen la expresión de VEGF en líneas celulares de carcinoma tiroideo y en células de la corteza adrenal en cultivo [79;80]. Las gonadotrofinas son potentes inductoras de la transcripción de VEGF en ovario, tanto *in vivo* como *in vitro* [81]. Existen además diversos estudios que ubican a los esteroides sexuales como potentes inductores de la expresión de VEGF en tejidos hormonosensibles [82-84].

Los receptores de VEGF descritos son tres receptores de tipo tirosina quinasa denominados VEGFR-1 (también llamado FLT-1), VEGFR-2 (también llamado KDR o Flk-1) y VEGFR-3 (llamado también FLT-4). Tanto FLT-1 como KDR poseen siete

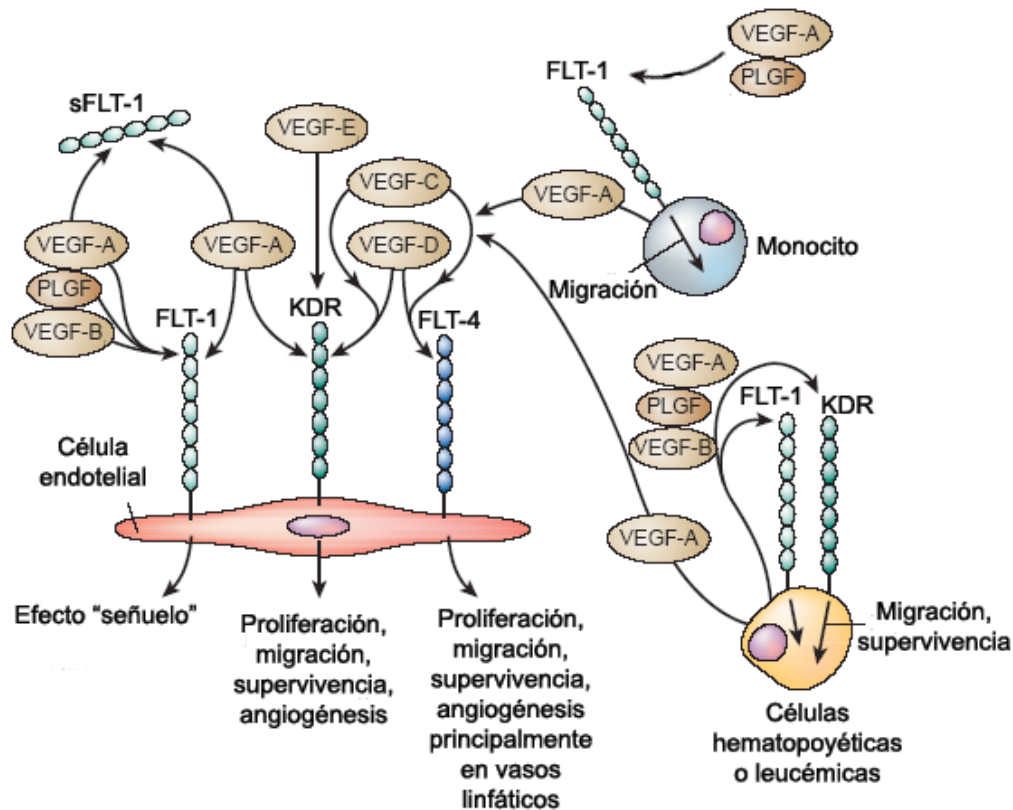
dominios semejantes a inmunoglobulina (Ig-like) en su región extracelular, un único dominio transmembrana y una secuencia consenso tirosina quinasa (figura 6) [76]. FLT-4 tiene en el dominio extracelular, cuatro regiones Ig-like unidas mediante puentes disulfuro a otras dos regiones Ig-like. Este último receptor, no es receptor de VEGF-A sino de VEGF-C y VEGF-D [85]. FLT-1 y KDR unen VEGF-A con alta afinidad aunque la afinidad de este factor de crecimiento por KDR es un poco menor que por FLT-1. A su vez, las propiedades de transducción de la señal al unirse el ligando, también son diferentes para estos dos receptores. Mientras que KDR sufre una fosforilación en tirosina fuertemente dependiente del ligando, la fosforilación de FLT-1 es débil [86]. Por lo tanto, para que se produzcan las respuestas biológicas por acción del VEGF-A, es necesario que este se una al receptor KDR.

Respecto al receptor FLT-1, su función es aún objeto de debate. Es regulado por hipoxia, al igual que el VEGF-A [87]. Se une al VEGF-A, VEGF-B y PlGF. Existe una forma alternativa soluble de este receptor (sFLT-1) que actúa como inhibidor de VEGF-A [88]. Como se ha mencionado anteriormente, este receptor sólo sufre una débil fosforilación al unirse a su ligando, por lo que ha sido propuesto que este receptor no actuaría como tal, sino como un receptor “señuelo”, capaz de regular en forma negativa la actividad de VEGF-A en el endotelio vascular mediante el secuestro del ligando y la subsecuente menor disponibilidad para que pueda unirse a KDR [89]. Esta función señuelo, podría ser cumplida no solo por el FLT-1 de secuencia completa sino también por sFLT-1. Otros trabajos sin embargo, indican que FLT-1 es capaz de interactuar con diversas proteínas transductoras de señales y generar una señal mitogénica [90]. También se ha descrito una transfosforilación de KDR luego de la unión del ligando a FLT-1 [91].

KDR es el principal receptor para VEGF-A responsable de la angiogénesis, mitogénesis y aumento de la permeabilidad vascular observados como respuestas a VEGF-A. Luego de la autofosforilación de este receptor en diversas tirosinas, se observa la fosforilación de varias proteínas transductoras de señales, como ser fosfolipasa C (PLC), PI3 quinasa (PI3K), proteína activadora de ras GTPasa, entre otras. VEGF-A, a través de su receptor KDR, activa las vías de señalización de PI3K/Akt y

Raf-Mek-Erk [76]. El receptor KDR además, media los efectos antiapoptóticos de VEGF-A descritos en células endoteliales [72].

En la **figura 4** puede verse un esquema de las diferentes proteínas que conforman la familia del VEGF y sus receptores.



**Figura 4: Rol de VEGF y sus receptores en distintos tipos celulares.** *FLT-1* y *KDR* se encuentran expresados en la mayoría de las células endoteliales vasculares, mientras que *FLT-4* se encuentra exclusivamente en las células endoteliales linfáticas. *VEGF-A* se une a *FLT-1* y *KDR*. Por el contrario, *PLGF* y *VEGF-B* interactúan sólo con *FLT-1*. *VEGF-E* es un agonista selectivo de *KDR*. *VEGF-C* y *VEGF-D* se unen a *KDR* y *FLT-4*. Existen evidencias que *KDR* es el principal mediador de la mitogénesis y la supervivencia de células endoteliales, así como de la angiogénesis y la permeabilidad microvascular. En contraste, *FLT-1* no media una señal mitogénica eficaz en células endoteliales y puede, especialmente durante el desarrollo embrionario temprano, realizar un papel inhibitorio secuestrando *VEGF* y previniendo su interacción con *KDR*. *FLT-1* soluble se genera por splicing alternativo de *FLT-1* de membrana.

*Sin embargo, FLT-1 tiene un papel de señalización establecida en la mediación de la quimiotaxis de monocitos. Además, en las células madre hematopoyéticas o células leucémicas, tanto FLT-1 y KDR pueden mediar la quimiotaxis y supervivencia celular. Adaptado de Ferrara et al., 2003 [92].*

### **Angiopoyetinas**

Mientras que el VEGF 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. Entre estos se encuentran las angiopoyetinas 1 y 2 (ANGPT-1 y ANGPT-2) las cuales actúan a través de sus receptores tirosina quinasa Tie-1 y Tie-2 [93]. Se han descrito además, otros dos miembros de la familia de las angiopoyetinas, la ANGPT-3 y la ANGPT-4, aunque se acepta que ambas representan un mismo locus del gen en ratón y en humanos respectivamente. ANGPT-1 y ANGPT-4 activan Tie-2 mientras que ANGPT-3 inhibe la fosforilación del receptor inducida por ANGPT-1 [94].

Las acciones de las ANGPTs son diferentes a las de VEGF-A. ANGPT-1 actúa en forma coordinada y complementaria al VEGF-A, jugando un papel más tardío en el desarrollo vascular. El sistema de ANGPTs es crítico para el normal desarrollo, maduración y estabilización de los vasculatura en desarrollo [95], así también para promover la quiescencia e integridad estructural de la vasculatura adulta [96]. Sin embargo, además de la función estabilizante, la ANGPT-1 estimula la remodelación y la angiogénesis [97]. La sobreexpresión de ANGPT-1 en ratones transgénicos produce mayor número de vasos, los cuales son de diámetro aumentado y altamente ramificados [97;98].

En un vaso en estado quiescente, las células endoteliales se encuentran unidas fuertemente entre sí a través de uniones intercelulares y no proliferan. Por el contrario, durante el proceso de angiogénesis, las células pierden los contactos célula-célula y comienzan a proliferar y migrar, lo que resulta en la brotación y la ramificación de los vasos pre-existentes para formar un nuevo vaso [99]. Fukuhara y col., estudiaron la

señalización diferencial de ANGPT-1/Tie-2 durante la quiescencia y la angiogénesis dependiente de los contactos célula-célula. En condiciones confluentes, oligómeros de ANGPT-1 actúan como puente uniendo Tie-2 en los contactos célula-célula. Esta unión en trans entre células activa preferentemente las vías de señalización Akt-Foxo1 y Akt-eNOS, las cuales podrían contribuir en el mantenimiento de la quiescencia vascular mediante la mejora de la supervivencia endotelial y la integridad. Por otro lado, en ausencia de contactos célula-célula, Tie-2 forma un complejo con la matriz extracelular uniendo ANGPT-1 en los contactos célula-sustrato. ANGPT-1/Tie-2 anclado a los contactos célula-sustrato activa preferentemente la vía de señalización de Erk, la cual podría contribuir a estimular la migración y la proliferación de la célula endotelial, promoviendo la angiogénesis [100].

La unión de la ANGPT-1 a su receptor induce la autofosforilación del mismo en su dominio quinasa. Contrariamente a esto, la unión de la ANGPT-2 a su receptor no estimula su fosforilación y además, es capaz de inhibir la activación y la migración de células endoteliales producida por ANGPT-1, lo que sugiere que ANGPT-2 es un antagonista natural de los receptores Tie [93;101]. Sin embargo, más recientemente ha sido demostrado, que en ciertas circunstancias ANGPT-2 es capaz de estimular a su receptor Tie-2. Aparentemente, ANGPT-2 actúa como agonista sobre su receptor en vasos linfáticos, mientras que podría actuar como antagonista sobre vasculatura endotelial [102]. Se postula que ANGPT-2 es un factor desestabilizante de vasos sanguíneos, permitiendo que otros factores angiogénicos puedan ejercer sus efectos [103].

Mientras que la ANGPT-1 se expresa ampliamente y en forma constitutiva en tejidos adultos normales para cumplir su función estabilizadora de los vasos sanguíneos ya formados, ANGPT-2 está altamente expresada sólo en sitios con alto grado de angiogénesis y en sitios de regresión de vasos sanguíneos. La alta expresión de ANGPT-2 resulta en la desestabilización de los vasos sanguíneos, lo que, en presencia de VEGF-A, conduce a la proliferación de las células endoteliales y formación de vasos sanguíneos nuevos. Por otra parte, la alta expresión de ANGPT-1 en ausencia de VEGF-A, resulta en la regresión de la vasculatura [93]. ANGPT-3 está distribuida en diversos

tejidos murinos, incluyendo corazón, riñón y testículo, mientras que ANGPT-4 ha sido descrita solo en pulmón humano [94].

La regulación de la expresión de las ANGPTs está dada, al igual que para el VEGF-A, por diversos factores. Como inhibidores de la expresión de ANGPT-1 *in vitro*, se pueden mencionar la hipoxia, el 17- $\beta$ -estradiol y el suero. Entre los principales inductores de ANGPT-2 se encuentran la hipoxia, el VEGF-A, bFGF, la leptina y la trombina, todos ellos, inductores de la expresión de ANGPT-2 en células endoteliales. El TGF $\beta$ , la ANGPT-1 y la ANGPT-2 inhiben la expresión de ANGPT-2 [102].

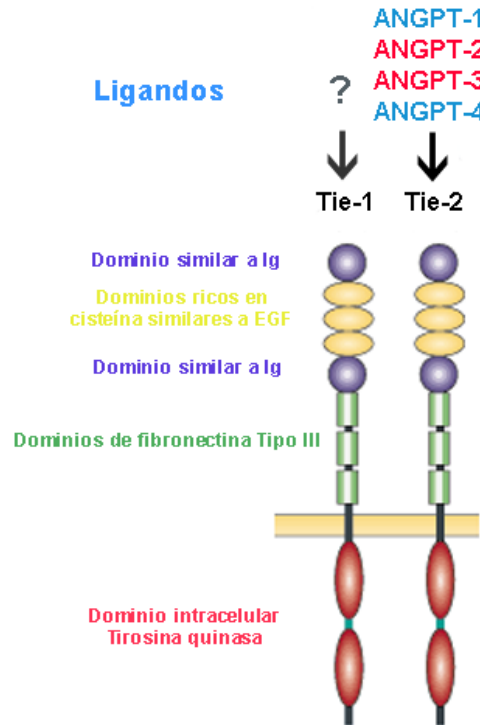
La familia de receptores de ANGPTs está compuesta por dos miembros, Tie-1 y Tie-2 (también llamados Tek). El dominio extracelular consiste en tres dominios ricos en cisteína similares a EGF, dos dominios similares a Ig y tres dominios de fibronectina tipo III. Los dominios similares a Ig corresponden al sitio de unión de las ANGPTs. La región intracelular está compuesta por dos dominios conservados de tipo tirosín kinasa [104] (**Fig. 5**).

Todas las ANGPTs se unen al receptor Tie-2 y no al Tie-1. No ha sido aún descrito un ligando para Tie-1 [105]. Sin embargo, ha sido demostrado que los receptores Tie-1 y Tie-2 pueden asociarse vía sus dominios intracelulares sugiriendo que el Tie-1 actuaría modulando la señal de Tie-2 [106]. Los receptores Tie están ampliamente expresados tanto en endotelio embrionario como adulto. Tie-2 es fosforilado durante el desarrollo vascular (como por ejemplo en la ovulación o en la reparación de heridas) pero también en células endoteliales quiescentes [107].

A pesar de que originalmente se pensó que los receptores Tie estaban expresados exclusivamente en células endoteliales, hoy se sabe que se expresan en muchos tipos celulares en tejidos normales o patológicos, como ser fibroblastos, queratinocitos, células musculares lisas, células tumorales, neutrófilos, monocitos, eosinófilos, células ganglionares, neuronas, células gliales y células ováricas no endoteliales. [102;108-116}.

La unión de ANGPT-1 a su receptor Tie-2 produce la dimerización del receptor y su consecuente autofosforilación en residuos específicos de tirosina. Estos sitios

fosforilados actúan como sitios de unión para distintas moléculas efectoras. Estas moléculas son reclutadas a estos sitios y al interactuar con los mismos desencadenan la activación de diversas vías de señalización que conducen finalmente a las respuestas celulares de diferenciación, supervivencia, proliferación e interacción con la matriz extracelular observadas para ANGPT-1.



**Figura 5. Estructura de los receptores y ligandos del sistema ANGPT/Tie.** La familia de receptores Tie comprende dos miembros, Tie-1 y Tie-2 (también llamados TEK). La región extracelular de los receptores Tie consiste en uno dominio similar a inmunoglobulina (Ig) que se encuentra separado por tres dominios ricos en cisteína similar al factor de crecimiento epidermal (EGF) y seguido por tres dominios de fibronectina tipo III. La porción intracelular contiene dominios tirosina quinasa. ANGPT-1 y ANGPT-4 actúan como agonistas de Tie-2, mientras que los ligandos ANGPT-2 y ANGPT-3 actúan como antagonistas de Tie-2. Adaptado de Jones N. y col., 2003 [117]

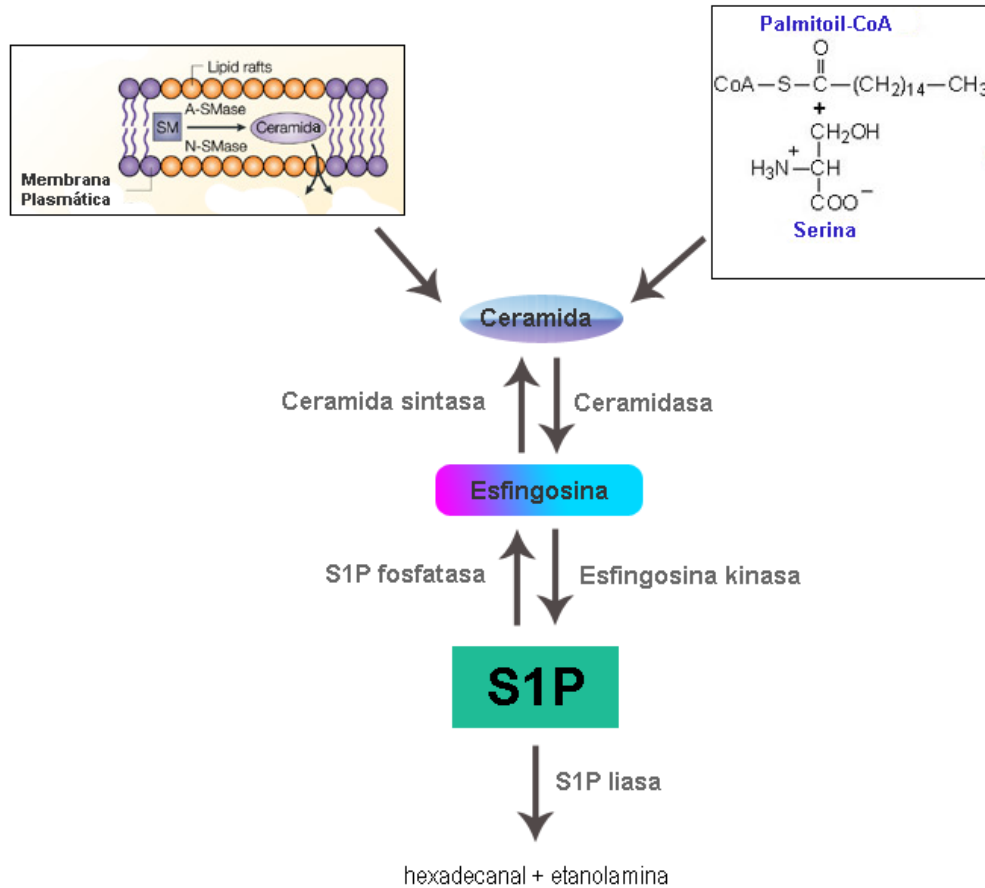


### **Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)**

Otro potente factor angiogénico es el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Se conocen 5 isoformas de PDGF (A, B, C, D y E) que se unen entre sí formando homo- o heterodímeros [118;119]. Sus efectos biológicos están mediados por dos receptores del tipo tirosina quinasa, receptores PDGF $\alpha$  y  $\beta$  [120]. La unión a sus receptores desencadena respuestas involucradas en procesos fisiológicos como patológicos que incluyen crecimiento celular y supervivencia [121;122], transformación [123], migración celular [124], permeabilidad vascular [125], y cicatrización de heridas [120;126]. Además, la activación del PDGFR por sus ligandos induce diferentes mecanismos de transducción de señales que involucran la vía fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K), fosfolipasa C $\gamma$ , MAPK y la familia STATs, entre otros [127]. A nivel angiogénico, el PDGF-BB cumple un rol fundamental en el reclutamiento de células periendotheliales (pericitos y células de músculo liso) para estabilizar los vasos sanguíneos y, por consiguiente, que estos vasos sean funcionales [128].

### **Esfingosina 1-fosfato (S1P)**

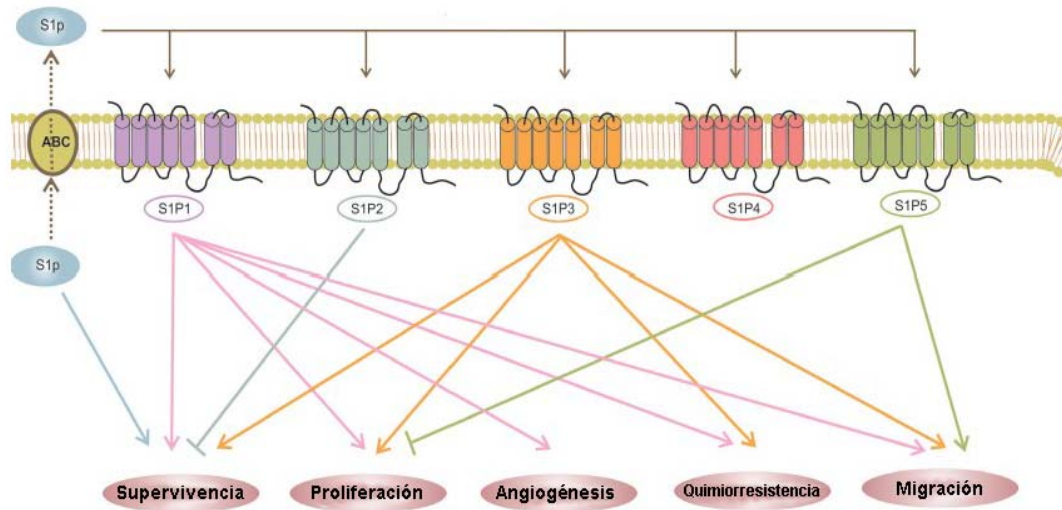
Los esfingolípidos están involucrados en la regulación del crecimiento y diferenciación celular, migración, apoptosis y angiogénesis [129-131]. La ceramida es el lípido central en el metabolismo de esfingolípidos. Se produce a través de una vía de síntesis *de novo*, o por la hidrólisis de esfingomielina presente en las membranas plasmáticas. Puede ser fosforilada por la ceramida quinasa (CerK) a ceramida 1 fosfato (C1P), o utilizarse para la síntesis de esfingomielina o los glicoesfingolípidos. La ceramida también puede ser degradada por ceramidasa a esfingosina, que a su vez es fosforilada por la esfingosina quinasa (SphK) para generar la esfingosina 1-fosfato (S1P) [132] (**Fig. 6**).



**Figura 6. Síntesis de S1P.** La ceramida es el lípido central en el metabolismo de esfingolípidos. Se produce a través de una vía de síntesis de novo, o por la hidrólisis de esfingomielina presente en las membranas plasmáticas. La ceramida puede ser degradada por ceramidasa a esfingosina, que a su vez es fosforilada por la esfingosina quinasa (SphK) para generar la esfingosina 1-fosfato (S1P). La esfingosina 1-fosfato liasa (S1P-liasa) es la enzima encargada de degradar de manera irreversible al S1P.

S1P se encuentra en suero y plasma [133]. Este esfingolípidos es un componente del HDL que es una lipoproteína de alta densidad [134]. Se ha mostrado que el S1P en el HDL correlaciona positivamente con HDL-colesterol, apo A-I y apo A-II [135]. Las principales fuentes de S1P son las plaquetas y las células hematopoyéticas [136-140].

El S1P actúa principalmente mediante la unión y activación específica de receptores de superficie celular acoplados a proteína G, denominados receptores de S1P (S1PRs). Pertenecen a una familia de receptores que contiene cinco subtipos: S1PR1, S1PR2, S1PR3, S1PR4, y S1PR5. Cada subtipo de receptor regula diversos eventos moleculares y celulares, incluyendo la supervivencia celular, la migración celular, la diferenciación y la angiogénesis [141] (**Fig. 7**).

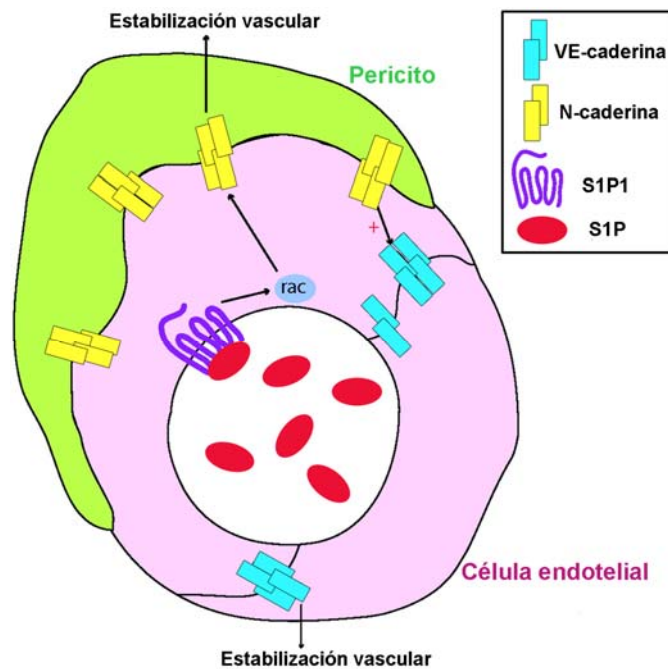


**Figura 7. S1P y sus receptores.** *S1P es sintetizado en el interior de la célula y transportado al espacio extracelular por transportadores ABC. Actúa de manera autócrina o parácrina activando los diferentes receptores S1P y media diversas funciones biológicas como supervivencia, migración, proliferación, angiogénesis y quimiorresistencia entre otras. Adaptada de Tabasinezhad y col., 2013 [142]*

Es importante destacar, que en un estudio se demostró que la administración *in vivo* de S1P inhibe la permeabilidad vascular inducida por VEGF, sugiriendo que el receptor S1P1 presente en las células endoteliales y periendotheliales (pericitos) es capaz de regular esta permeabilidad [143]. Además, Paik y col. demostraron que S1P a través del mecanismo de señalización Rac, promueve el tráfico de N-caderina (proteína de uniones adherentes) hacia la membrana plasmática de las células endoteliales, favoreciendo el contacto de estas células con los pericitos [144] (**Fig. 8**). Respecto a

esto, Luo y Radice (2005) mostraron que la expresión de VE-caderina disminuye drásticamente en ratones deficientes para N-caderina endotelial, causando una vasculatura inestable [145].

Gaengel et al. 2012, observaron que la pérdida del receptor S1P1 en células endoteliales lleva a un aumento en las ramificaciones y a la formación de vasos ectópicos. Por el contrario, la señalización por S1P1 inhibe el proceso de ramificación y aumenta la adhesión célula – célula. Esto se correlaciona con que la inhibición de VEGF-A induce la localización de VE-caderina en las uniones estrechas en células endoteliales. Por lo tanto, la señalización por S1P1 actúa como un mecanismo de estabilización vascular intrínseca, protegiendo a los vasos sanguíneos en desarrollo contra respuestas angiogénicas aberrantes [146].



**Figura 8. Interacción endotelio – pericito mediada por S1P.** *S1P1* media la estabilización vascular a través de los contactos entre N-caderina presentes en células endoteliales y pericitos. La localización de N-caderina en la membrana plasmática de las células endoteliales es dependiente de la activación de Rac a través de la vía S1P/S1P1. Adaptado de Armulik A y col., 2005 [147]

### ***S1P en el ovario***

El HDL del fluido folicular (HDL-FF) ha sido identificado como la única lipoproteína presente en el fluido antes de la ovulación [148]. Contrario al HDL del suero, el HDL-FF posee poca cantidad de colesterol pero es rico en fosfolípidos. Las apolipoproteínas apoA-I y apoA-IV son las principales proteínas que forman el HDL-FF. Varios estudios han demostrado que el HDL sérico actúa como un transportador de lisofosfolípidos biológicamente activos como son el S1P, la esfingosulfosforilcolina y la lisosulfatida [149-151]. El primer trabajo que demuestra la presencia de S1P en el FF humano es el de Von Otte et al [152]. Estos autores han mostrado que el S1P presente en el FF humano se encuentra unido al HDL, proporcionándole a esta molécula su capacidad mitogénica y proangiogénica. Los mecanismos de transducción involucrados en estos procesos son: ERK1/2, PKC y AKT. Más tarde, el mismo grupo mostró que en células de granulosa humana, el S1P induce migración celular y polimerización de filamentos de actina a través de la activación del receptor 3 de S1P (S1P3) y RAC1 [153].

Cabe destacar, que la concentración de S1P en FF y en suero es aproximadamente de 170 nmol/litro y de 900 nmol/litro, respectivamente. Se ha observado que ese rango de concentración de S1P en FF es capaz de estimular procesos que involucran tanto desarrollo vascular como migración [154;155].

### ***Ensayos in vitro e in vivo para evaluar angiogénesis***

Para evaluar los mecanismos bioquímicos y moleculares que participan durante el proceso de angiogénesis se han desarrollado métodos in vitro e in vivo. A continuación se detallarán los métodos más relevantes para estudiar la angiogénesis tanto en condiciones fisiológicas como patológicas ya que en esta tesis se desarrollaron varios de estos ensayos

### **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. Una vez que las células endoteliales han migrado y proliferado en respuesta al estímulo angiogénico, se diferencian para producir nuevos capilares. 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 [156].

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).

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 manera para medir permeabilidad vascular es mediante la tinción de los filamentos de actina con una toxina denominada faloidina unida a un marcador fluorescente. La disposición de los filamentos de actina dentro de la célula es crucial para el mantenimiento de las uniones entre células endoteliales, regulando de esta manera la permeabilidad vascular.

### **Ensayo *in vivo* de angiogénesis: 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 el sistema nervioso del embrión 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 [157;158], para cultivo de piel humana [159] y de hígado [160], así como también para analizar la toxicidad de biomateriales para ingeniería de tejidos [161]. El ensayo CAM (método *ex ovo*) consiste en transferir el embrión completo a placas de cultivo de plástico [162]. 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 [163].

### **Angiogénesis fisiológica en el ovario**

Se sabe que el ovario es uno de los pocos órganos en el adulto en donde ocurre una intensa angiogénesis fisiológica y se observa además un aumento en la permeabilidad vascular durante el desarrollo folicular, la ovulación y la posterior formación del cuerpo lúteo. La angiogénesis se encuentra regulada independientemente en cada uno de los folículos individuales y, dependiendo de la extensión del plexo vascular y de la permeabilidad de sus vasos, se puede controlar el suministro de factores tróficos de alto peso molecular, precursores y lípidos. Esto indicaría que los vasos sanguíneos foliculares estarían directamente involucrados en los procesos de selección, dominancia y atresia [164].

Los folículos primordiales y primarios reciben nutrientes y oxígeno por difusión pasiva de los vasos estromales. El crecimiento folicular se asocia en cambio, al desarrollo de una red capilar individual y a una angiogénesis continua destinada a nutrir el folículo en rápido crecimiento. Los vasos sanguíneos que se desarrollan están confinados a la capa tecal y están separados de la capa de células de granulosa por la presencia de la membrana basal. La capa de células de granulosa se mantiene avascular hasta su ruptura durante la ovulación [51].

A pesar de que la angiogénesis ocurre en la capa de células de la teca, las células de la granulosa juegan un papel muy importante en este proceso, ya que sintetizan y secretan diversos factores angiogénicos que actúan luego en forma paracrina en las células endoteliales de la capa tecal. Estos factores producidos por las células de granulosa controlarían el desarrollo y crecimiento de la vasculatura folicular [165]. El aumento de la vasculatura del folículo lleva a un suministro preferencial de gonadotrofinas y, por lo tanto, jugaría un rol en la selección del folículo dominante [21]. Por otro lado, la degeneración del lecho capilar es un factor relevante causante de atresia en folículos que no logran desarrollarse correctamente.

La producción de factores de crecimiento está regulada en forma diferencial dependiendo del tamaño del folículo. La expresión del ARNm y de la proteína de VEGF en ovario de primate está expresada en células tecales de folículos antrales y en células de granulosa cercanas al ovocito en folículos preovulatorios pero no en células de granulosa de folículos primordiales y preantrales [51]. En folículos bovinos y porcinos, VEGF-A está levemente expresado durante el desarrollo folicular temprano y esta expresión aumenta tanto en granulosa como en teca junto con el desarrollo del folículo dominante [166;167]. En ratas, tanto los niveles de la proteína de VEGF como de su receptor KDR aumentan en células de granulosa y tecales, a medida que el folículo crece [116].

Respecto a las angiopoyetinas, se han visto diferencias en su expresión durante el desarrollo folicular según la especie en estudio. En ratas, tanto la ANGPT-1 como la ANGPT-2 aumentan con el tamaño folicular en células de granulosa y tecales, mientras que la expresión proteica de su receptor Tie-2, es detectada sólo en células tecales de



folículos antrales tempranos y preovulatorios [116]. En cerdos, el ARNm de ANGPT-1 va disminuyendo con el tamaño folicular y la relación ANGPT-2/ANGPT-1 aumenta sin observarse cambios en la expresión de Tie-2 [168]. En vacas, el ARNm de ANGPT-1 aumenta mientras que el de ANGPT-2 disminuye a medida que el folículo crece, manteniéndose constante la expresión de Tie-2 [169].

En cuanto a los miembros de la familia de PDGF, se ha identificado que se expresan en ovarios de ratón, rata y humano [170-172]. Varios estudios han demostrado que el PDGF estimula la proliferación de las células de la teca de folículos antrales provenientes de ovarios de rata y porcino [173-175]. Además, Sler y col. han mostrado que las isoformas PDGFAA y PDGFBB favorecen el crecimiento de los folículos preantrales [171]. En el mismo año, dichos autores demostraron que los niveles de ARNm de varios miembros de la familia de PDGF se encontraban aumentados durante la luteogénesis [176].

Por otro lado, también se ha demostrado la participación de los esfingolípidos en la fisiología ovárica. Varios trabajos han mostrado que el S1P es capaz de proteger a las células germinales de la citotoxicidad inducida por drogas quimioterapéuticas, restaurando la fertilidad en pacientes con cáncer [177;178]. También, en nuestro laboratorio se ha demostrado que el S1P inhibe el efecto luteolítico inducido por prostaglandina F<sub>2α</sub> en ovario de rata, postulándolo al S1P como un factor antiapoptótico [179]. Además de esta función, Von Otte y col. (2006) demostraron que el S1P presente en el fluido folicular humano (FF) poseía actividad mitogénica y angiogénica [152]. Más tarde el mismo grupo mostró que el S1P asociado a las partículas de HDL presente en FF promovía la migración de células de granulosa luteínica humana mediante la vía de activación Rac a través del receptor S1P3 [153].

### **Angiogénesis patológica en el ovario**

Los defectos en la angiogénesis en la mujer pueden contribuir a una variedad de desórdenes tales como anovulación e infertilidad, pérdida del embarazo, neoplasmas ováricos, síndrome de ovario poliquístico (PCOS) y **Síndrome de Hiperestimulación**

**Ovárica (OHSS)** [180-183]. Una de las características que poseen las pacientes con OHSS es poseer una angiogénesis alterada, con niveles elevados de sustancias vasoactivas en suero, fluido peritoneal y fluido folicular [183;184].

### **SÍNDROME DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA (OHSS)**

El *Síndrome de Hiperestimulación Ovárica (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 realiza estimulación ovárica con altas dosis de gonadotrofinas [185-187].

El síndrome se conoce desde 1943 cuando se utilizaban para la estimulación o inducción de la ovulación, preparados de gonadotrofinas de suero de yegua preñada, preparaciones hipofisarias de oveja o gonadotrofinas coriónica humana de origen urinario. En ese momento, la enfermedad se denominó en francés “*síndrome d’hyperlutéinisation massive des ovaires*”. El primer caso fatal de OHSS fue descrito en 1951 por Gotzsche con oliguria y falla renal llevando a la paciente a la muerte [186].

En los tratamientos de fertilización asistida, el éxito depende en gran medida de los protocolos de estimulación ovárica empleados, con los que se pretenden obtener ovocitos que puedan derivar en embriones de buena calidad, con capacidad de implantación y, de esa forma, generar un embarazo evolutivo. La estimulación ovárica se realiza con gonadotrofinas (generalmente FSH recombinante), seguida de la administración de hCG (gonadotrofina coriónica humana) para inducir la maduración ovocitaria y permitir el soporte de la fase lútea. La hCG tiene estructura y actividad biológica similar a LH, pero con mayor vida media, que resulta en un efecto luteotrófico sostenido y por lo tanto en el desarrollo de múltiples cuerpos lúteos funcionales.

### **Rasgos clínicos y clasificación de OHSS**

En la forma inicial de OHSS ocurre aumento del tamaño de los ovarios acompañado por malestar abdominal. En casos más avanzados, los ovarios se vuelven quísticos y esto puede resultar en distensión y dolor abdominal, náuseas, vómitos y a veces diarrea. Estos síntomas digestivos se pueden hacer presentes luego de las 48 horas de administrar hCG, aunque se vuelven más severos entre los 7 y 10 días post inyección de hCG.

Los signos subsiguientes son probablemente el resultado de una disfunción circulatoria correspondiente a un aumento en la permeabilidad vascular y una marcada dilatación arterial. Estos síntomas pueden ser seguidos de presencia de ascitis leve, la cual puede ser sólo visualizada a través de ecografía intravaginal, mientras que en casos más severos la ascitis es clínicamente detectable. La ascitis se caracteriza por una alta concentración de proteínas, un bajo recuento leucocitario, y presencia de alto número de glóbulos rojos. El exudado extravascular, rico en proteínas, acumulado en el peritoneo, en el plasma y a veces en el espacio pericárdico, es asociado con depleción del volumen intravascular, hemoconcentración, activación de vasoconstrictores y factores antinatriuréticos, hipoalbuminemia severa y a veces hipovolemia. También puede ocurrir disfunción hepática. Los efectos cardiovasculares incluyen hipotensión arterial, volumen de fluido reducido, baja presión de la vena central, taquicardia, hemoconcentración, e hipercoagulación. Por otro lado, la disminución de la perfusión renal induce estimulación de los túbulos renales y reabsorción de sodio y agua que resulta en manifestaciones clínicas de oliguria [188]. Los fenómenos tromboembólicos son la complicación final de OHSS, que podrán resultar en casos fatales [185-187]. Asociada a la ascitis, la ileus peristáltica, puede dañar el movimiento diafragmático originándose problemas respiratorios. Si la efusión pleural también se desarrolla, la función pulmonar se ve afectada seriamente y lleva al síndrome de diestrés respiratorio agudo (ARDS). Los fenómenos tromboembólicos son la última complicación de OHSS, y en algunos casos resultan fatales a pesar de la aplicación de un tratamiento adecuado [186].

En base a estos rasgos clínicos, tradicionalmente, OHSS ha sido clasificado en tres estadios, y en cinco grados según su intensidad (*Tabla 1*) [187].

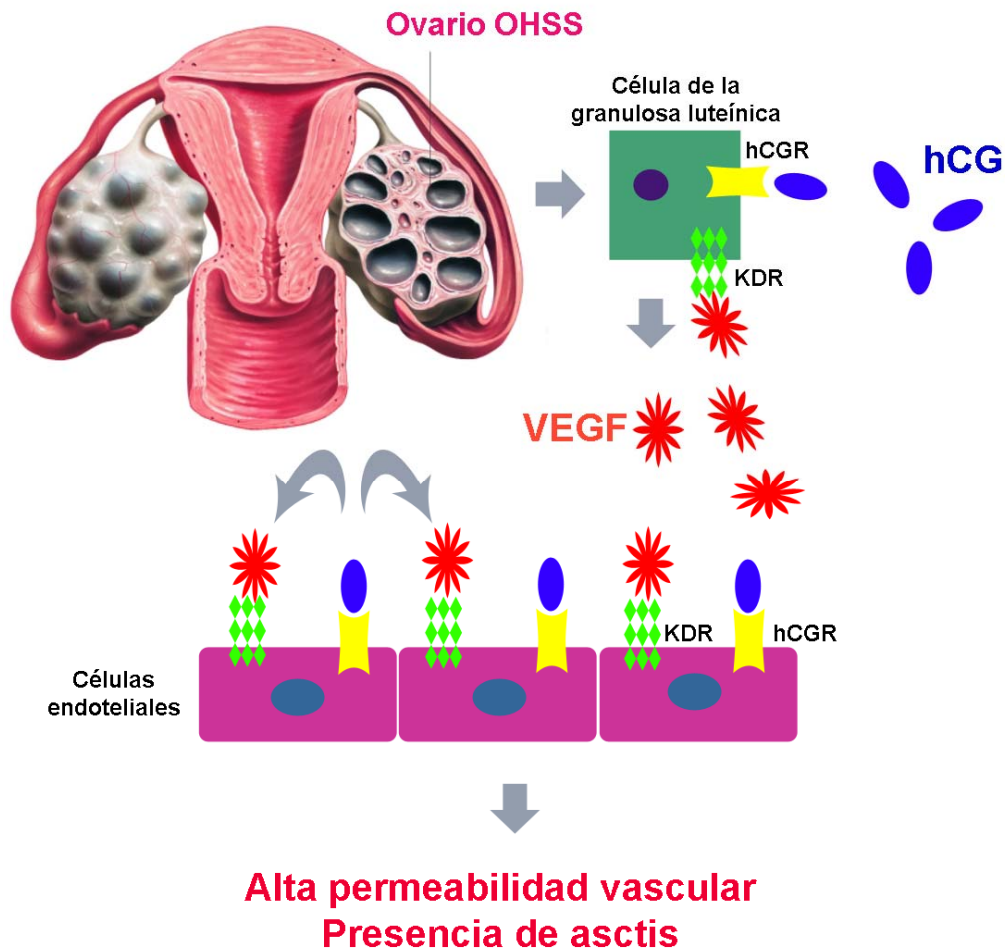
**Tabla 1: Clasificación del Síndrome de Hiperestimulación ovárica (OHSS).**

Estadio		Características
Leve	Grado 1	Distensión e incomodidad abdominal.
	Grado 2	Grado 1, más vómitos, diarrea y aumento del tamaño de los ovarios de (5-12 cm)
Moderado	Grado 3	Grado leve, más presencia ecográfica de ascitis.
Severo	Grado 4	Grado moderado, más signos de ascitis/hidrotórax o dificultad respiratoria.
	Grado 5	Grado 4, más cambios en el volumen sanguíneo, aumento de la viscosidad sanguínea por hemoconcentración, trastornos de la coagulación y eventos tromboembólicos.

### *Etiología de OHSS*

Si bien la causa de OHSS es compleja y en algunos aspectos aún permanece sin estar dilucidada, se sabe que la administración de hCG induce la liberación de mediadores que tienen efecto sobre el sistema vascular, el cual es el responsable de las consecuencias clínicas de OHSS y juega un rol en el desarrollo de este síndrome. Se ha observado que los niveles séricos de VEGF aumentan luego de la administración de hCG en mujeres hiperestimuladas con riesgo a desarrollar OHSS [183;189;190]. Además, las concentraciones de VEGF en suero, fluido peritoneal y folicular en pacientes con riesgo de OHSS se encuentran correlacionadas positivamente con el desarrollo del síndrome [184;191;192]. Varios autores han mostrado que el VEGF de pacientes con OHSS proviene del ovario hiperestimulado debido a que la concentración de VEGF en fluido folicular es 100 veces mayor comparado al del suero [184;192]. Asimismo, se ha observado en mujeres que desarrollan la enfermedad OHSS, que el

VEGF se expresa en células de granulosa-luteínicas y se libera al fluido folicular en respuesta a hCG, aumentando la permeabilidad vascular (**Fig. 9**) [193]. Por otro lado, estudios *in vitro*, han demostrado que la administración de hCG en células de la granulosa luteínicas humanas aumenta los niveles del ARNm de VEGF de manera dosis y tiempo dependiente [194]. Por lo tanto, se considera que el VEGF es el principal mediador en el desarrollo de OHSS



**Figura 9: Fisiopatología de Síndrome de Hiperestimulación Ovárica.** La hormona liberadora de gonadotropinas (hCG) estimula en las células de la granulosa-luteínicas a sintetizar y liberar grandes cantidades de VEGF. El receptor KDR también es estimulado en células de la granulosa-luteínicas y células endoteliales en respuesta a hCG. El VEGF liberado por las células de la granulosa-luteínicas se une a los receptores KDR en células endoteliales aumentando la permeabilidad vascular. Adaptado de Soares y col., 2008 [194].

Sin embargo, además del VEGF se han descriptos factores adicionales que estarían involucrados en la patogénesis de este síndrome. Rizk y col en 1997 demostraron que las citoquinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$ ) se encontraban aumentadas en suero, fluido folicular y ascítico de pacientes con OHSS severo [195]. A su vez, otras moléculas, como la histamina, la prolactina, la IL-6, la IL-1 $\beta$  y el sistema renina – angiotensina también han sido propuestas como relevantes en el desarrollo de OHSS [183;196;197].

Además, hay trabajos que demuestran que el aumento en la permeabilidad vascular depende de otras moléculas, como la proteína de uniones adherentes VE-caderina que juegan un rol en el desarrollo y progresión de OHSS severo [194].

Por otra parte, el OHSS, no solo puede ocurrir durante la fase lútea, sino también durante la primer parte del embarazo a causa de la hCG endógena [198]. Además, Si bien la mayoría de los casos de OHSS son causas iatrogénicas, existe una forma de OHSS espontánea dada por una mutación en el gen del receptor de la FSH (FSHR) que genera una hiperrespuesta a la FSH circulante y además reacciona con moléculas de estructura similar como la hCG o la TSH (tirotropina) [199].

En nuestro laboratorio, demostramos en el modelo de OHSS desarrollado en rata, que la administración *in vivo* de un agonista de GnRH, Acetato de Leuprolide, disminuía la expresión de P450scc, StAR, ANGPT-1 y su receptor Tie-2 y afectaba la estabilidad vascular y la proliferación de células del cuerpo lúteo conduciéndolo a la regresión. En base a estos resultados, se sugirieron a los agonistas de GnRH como posible tratamiento para prevenir la patología de OHSS [200].

### **Incidencia de OHSS**

En Argentina, se ha observado que 3 de cada 10 mujeres poseen problemas para concebir. En la actualidad, debido al aumento en el número de mujeres que se someten a tratamientos de fertilización asistida se ha visto un incremento en el desarrollo de OHSS. La incidencia actual de OHSS es del 0.5-5% en forma grave, 3-6% para la forma

media y 20-33% para la forma leve, que normalmente no requiere tratamiento. Estos porcentajes están determinados sobre el total de ciclos de estimulación ovárica. Aunque estos datos indican que la prevalencia de la forma severa es baja, es importante destacar que este síndrome es una complicación causada por procedimientos de fertilización asistida que en algunos casos pueden requerir cuidados intensivos inmediatos.

### **Factores de riesgo que influyen en la incidencia**

El conocimiento de los factores de riesgo y la observación de las condiciones clínicas son útiles para predecir qué pacientes son susceptibles de presentar una hiperestimulación ovárica severa. Los factores que se deben considerar son:

*Edad:* Existe una correlación inversa entre la edad de la mujer y el desarrollo del síndrome. Esto puede deberse a que los ovarios de mujeres jóvenes (<35 años) tienen mayor densidad de receptores para gonadotrofinas, siendo sus ovarios más sensibles o bien porque poseen un mayor número de folículos que son capaces de responder a las gonadotrofinas [186].

*Síndrome de ovario poliquístico (PCOS):* Esta patología cursa con hiperandrogenismo, oligomenorrea, altos niveles de LH y más de 10 quistes ováricos de tamaño <10mm. En estas pacientes se han detectado niveles bajos de proteínas de unión IGF-1BP, especulándose que los niveles excesivamente altos de IGF-1 libres podrían incrementar la sensibilidad ovárica a la estimulación con gonadotrofinas, incrementado el riesgo de hiperestimulación [186]. Además las pacientes con PCOS tienen alta expresión de VEGF en ovario [201;202]. Luego de la estimulación con hCG en estas pacientes, los valores de VEGF aumentan considerablemente, los cuales pueden influir en el desarrollo de OHSS severo [183;201].

*Alergias:* Una respuesta inflamatoria con presencia de citoquinas inmunomoduladoras se asocia al desarrollo del síndrome [185].

### *Métodos actuales de prevención de OHSS*

La prevención y la detección temprana de OHSS son importantes para asegurar la salud de la paciente. El primer paso es la identificación de los factores de riesgo con el fin de individualizar el régimen de estimulación, y en segundo lugar, es necesario un estricto monitoreo de la respuesta a la estimulación que permitirán tomar medidas preventivas ante una respuesta ovárica exagerada.

Los criterios de selección de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS son: presencia de concentraciones séricas de E<sub>2</sub> mayores a 3000 pg/ml, más de 18 folículos de entre 10 y 14 mm de diámetro, el número de ovocitos recuperados en la aspiración y/o presencia de ovario poliquístico [186]. Estos parámetros se controlan por medio de una ecografía transvaginal combinada con la medición de la concentración de E<sub>2</sub> en suero durante la estimulación. A pesar del monitoreo de la ovulación por ultrasonido y de la medición de los niveles de E<sub>2</sub>, estas medidas son aún insuficientes para detectar los casos de OHSS. Debido a ello, se aplican además otras medidas para evitar una respuesta ovárica exagerada.

Las posibles soluciones para evitar o reducir OHSS son las siguientes:

❖ *Cancelación del ciclo*: Está establecido que no administrar hCG cuando los niveles de E<sub>2</sub> son demasiados altos previene el riesgo a desarrollar OHSS severa. [185]. Si bien, este método previene la aparición de OHSS, tiene un costo emocional y económico elevado.

❖ *“Coasting”*: Este método se basa en los niveles de E<sub>2</sub> séricos durante la estimulación ovárica. Cuando hayan aumentado antes de la administración de hCG, lo cual indica riesgo de OHSS, las gonadotrofinas exógenas se dejan de administrar, mientras que un agonista de GnRH es mantenido. La administración de hCG se pospone hasta que los niveles de E<sub>2</sub> decrezcan a un valor seguro, atestiguando atresia folicular. Las ventajas de este método es que no se cancela el ciclo; sin embargo, se le asocian varias desventajas como la disminución en la calidad y en el número de ovocitos recolectados post-coasting, especialmente cuando el período es prolongado [185].



❖ *Criopreservación de embriones*: La criopreservación de todos los embriones de las pacientes con riesgo a desarrollar OHSS. Con esta estrategia no se evita la aparición de OHSS ya que se le administró hCG a la paciente, pero se realiza con el fin de evitar el desarrollo de OHSS a causa de la hCG endógena [186]. Además, la tasa de embarazo con embriones congelados es menor respecto a embriones frescos [203-205].

❖ *Agonistas de GnRH*: La sustitución de la hCG por agonistas de GnRH se basa en la habilidad de éstos por inducir un pico de LH endógeno que induzca la maduración folicular.

❖ *Utilizar LH recombinante (LHr)*: La administración de LHr podría reducir la severidad de OHSS debido a que esta hormona tiene menor afinidad por el receptor que la hCG y a su vez, tiene menor vida media. Sin embargo, este método tiene menor eficiencia.

❖ *Albúmina*: La administración de albúmina endovenosa en el momento de la captura de los ovocitos se emplea para prevenir la permeabilidad asociada a OHSS. La albúmina aumenta la presión oncótica intravascular para evitar la salida de líquido y unirse a proteínas vasoactivas y evitar que éstas puedan ejercer su acción [206]. Sin embargo, varios reportes contradictorios se han publicado desde su utilización para la prevención del síndrome [204;207-210].

El creciente número de ciclos de fertilización asistida de alta complejidad que se registra en todo el mundo se acompaña de un incremento del número de casos de OHSS. Aunque existen muchos estudios clínicos publicados que aplican las estrategias antes mencionadas, en la actualidad no existe ningún tratamiento completamente efectivo para el manejo del OHSS. Por el momento, el monitoreo clínico para reconocer rápidamente la paciente en riesgo y los signos y síntomas tempranos del síndrome, son los pilares más importantes en la prevención y el tratamiento de estas pacientes.

Por lo tanto, el estudio de la fisiopatología de este síndrome permitirá encontrar nuevas estrategias terapéuticas que permitan que mujeres con alto riesgo a desarrollar OHSS y/o mujeres que hayan sufrido OHSS en ciclos anteriores, lleguen al final del protocolo sin la cancelación del ciclo, y puedan lograr un embarazo exitoso.

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

Los defectos en la angiogénesis ovárica pueden contribuir a una variedad de desórdenes como la anovulación e infertilidad, la pérdida de embarazo, la poliquistosis ovárica (PCOS), el *síndrome de hiperestimulación ovárica (OHSS)* y los neoplasmas ováricos [92;182;183]. Una de las características de las pacientes con OHSS es poseer una angiogénesis alterada, con niveles elevados de sustancias vasoactivas en suero, fluido peritoneal y fluido folicular [183;211]. El OHSS es una complicación iatrogénica severa del crecimiento y maduración folicular ocasionada por la inducción de la ovulación con gonadotrofinas en tratamientos de fertilización asistida (Assisted Reproductive Technologies, ART). La prevalencia de OHSS se encuentra entre el 5-10% de las pacientes que se someten a ART. Además, la forma severa de OHSS afecta al 0,5-5% de estas pacientes, requiriendo cuidados intensivos inmediatos [185;186]. Una de las características principales del OHSS es un aumento significativo de la permeabilidad de la microvasculatura. Varios sistemas colaboran en forma coordinada y complementaria en la regulación de la permeabilidad vascular entre ellos, el sistema del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), el sistema de angiopoyetinas (ANGPTs), el sistema del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el sistema de esfingosina-1 fosfato (S1P) [147;212-214]. Se ha demostrado que el VEGF es uno de los principales candidatos involucrados en la patogénesis de OHSS, induciendo la permeabilidad vascular y por consiguiente, la presencia de ascitis en las pacientes [184;215]. Sin embargo, hasta ahora, no existe ningún estudio que haya evaluado la participación del sistema de ANGPTs y del sistema de S1P en el desarrollo de este síndrome.

En base a estos antecedentes, se postularon las siguientes *hipótesis*:

***\* La inhibición del sistema de VEGF o del sistema de ANGPTs en la patología de OHSS afecta la angiogénesis ovárica, disminuyendo la permeabilidad vascular que conduce a la presencia de ascitis observada en este síndrome y por consiguiente, mejora la función ovárica.***

*\* Los niveles de SIP se encuentran disminuidos en pacientes con riesgo a desarrollar OHSS, siendo en parte responsable de la alta permeabilidad vascular observada en estas pacientes.*

Debido a que en la actualidad es escasa la información que se dispone acerca de la fisiopatología de OHSS y de sus posibles tratamientos, se plantearon los siguientes *objetivos generales*:

*1) Estudiar el efecto in vivo que produce el bloqueo de la acción de VEGF sobre la angiogénesis ovárica, su relación con el desarrollo folicular y la formación del cuerpo lúteo, la apoptosis y la proliferación de células ováricas en un modelo de OHSS desarrollado en rata.*

*2) Estudiar el efecto in vivo que produce el bloqueo de la acción de VEGF sobre la morfología y la proliferación celular del endometrio en el modelo mencionado anteriormente.*

*3) Evaluar los niveles de los miembros del sistema de ANGPTs/Tie en un modelo de OHSS desarrollado en rata.*

*4) Evaluar el efecto in vitro que produce la estimulación con hCG sobre la expresión de los miembros del sistema ANGPTs/Tie-2 en cultivos de células de granulosa-luteínicas humanas provenientes de pacientes sometidas a técnicas de reproducción asistida (ART) con alto riesgo a desarrollar OHSS*

*5) Determinar los niveles de los miembros del sistema de ANGPTs/Tie como del esfingolípido SIP en fluidos foliculares (FF) provenientes de pacientes sometidas a ART con alta probabilidad de desarrollar OHSS.*

*6) Analizar el efecto que producen los FF provenientes de pacientes sometidas a ART con alta probabilidad de desarrollar OHSS incubados con un inhibidor de ANGPT-1 o con SIP en un modelo in vitro e in vivo de angiogénesis (línea humana de células endoteliales y membrana corionalantoidea de embrión de codorniz, CAM).*

De acuerdo a los objetivos generales, se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

**1.** Estudiar el efecto *in vivo* que produce el bloqueo de la acción del factor angiogénico VEGF en un modelo de OHSS desarrollado en rata sobre:

1.1. El desarrollo folicular, la ovulación y la formación del cuerpo lúteo (CL).

1.2. La esteroidogénesis ovárica.

1.3. La apoptosis y la proliferación celular ovárica.

1.4. La permeabilidad vascular.

1.5. El crecimiento de la red vascular ovárica.

1.6. La expresión ovárica de los receptores de VEGF: KDR y Flt-1.

1.7. El mecanismo de transducción de señales de VEGF: vía PI3-kinasa/Akt.

1.8. La morfología y la proliferación celular en endometrio.

**2.** Determinar los niveles ováricos de los miembros del sistema de ANGPTs/Tie en un modelo de OHSS desarrollado en roedor.

**3.** Determinar los niveles proteicos de ANGPT-1, ANGPT-2 y su receptor soluble, Tie-2 soluble, en FF provenientes de pacientes sometidas a ART con alta probabilidad de desarrollar OHSS.

**4.** Evaluar el efecto *in vitro* que produce la estimulación con hCG sobre la expresión de ANGPT-1, ANGPT-2 y su receptor de membrana, Tie-2, en cultivos de células de

granulosa-luteínicas humanas provenientes de pacientes sometidas a ART con alta probabilidad de desarrollar OHSS.

**5.** Analizar el efecto que producen los FF provenientes de pacientes sometidas a ART con alta probabilidad de desarrollar OHSS incubados con *un inhibidor de ANGPT-1* en:

**5.1 Línea humana de células endoteliales sobre:**

5.1.1. La migración celular

5.1.2. La polimerización de filamentos de actina (integridad del citoesqueleto)

5.1.3. La expresión de proteínas de uniones endoteliales involucradas en permeabilidad vascular (*Uniones estrechas*: Claudina-5, ZO-1, *Uniones adherentes*: VE-caderina,  $\beta$ -catenina)

**5.2 Membrana corionalantoidea de embrión de codorniz japónica (CAM) sobre:**

5.2.1. Número y calibre de ramificaciones vasculares

5.2.2. Niveles endógenos de la integrina  $\alpha\beta 3$  (marcador de angiogénesis)

**6.** Determinar los niveles del esfingolípido esfingosina 1-fosfato (S1P) en FF provenientes de pacientes sometidas a ART con alta probabilidad de desarrollar OHSS.

**7.** Analizar el efecto que producen los FF provenientes de pacientes sometidas a ART con alta probabilidad de desarrollar OHSS incubados en presencia de *SIP* en:

**7.1. Línea humana de células endoteliales sobre:**

7.1.1 La expresión del receptor S1P1

7.1.2. La expresión de la enzima SP-liasa

7.1.3. La migración celular

7.1.4. La polimerización de filamentos de actina (integridad del citoesqueleto)

7.1.5. La expresión de proteínas de uniones endoteliales involucradas en estabilidad vascular: VE-caderina, N-caderina y  $\beta$ -catenina

**7.2. *Membrana corioalantoidea de embrión de codorniz (CAM) sobre:***

7.2.1. Número y calibre de ramificaciones vasculares

7.2.2. La co-localización de células endoteliales y periendoteliales en el plexo capilar

# MATERIALES Y MÉTODOS



### Tratamiento de los animales

Se utilizaron ratas prepúberes (*Rattus norvegicus*) de entre 21 y 23 días de la cepa Sprague Dawley, del Bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME-CONICET). Todos los protocolos y experimentos fueron aprobados por el comité de ética del IByME y llevados a cabo de acuerdo con la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio del NIH (Instituto Nacional de la Salud, USA). Los animales se mantuvieron en el bioterio en condiciones controladas de temperatura (21-23°C) y con un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (las luces se encienden a las 7.00 horas y se apagan a las 19.00 horas). Los animales recibieron agua y alimento balanceado *ad libitum*.

Se utilizó un modelo animal que desarrolla OHSS en ratas inmaduras Sprague Dawley (21 días, 60-80 g) [215-218]. Se dividieron al azar en 6 grupos y se inyectaron en forma subcutánea. A los 2 grupos Control se las inyectó con PMSG (gonadotrofina de suero de yegua preñada, Novormon, Syntex S.A.) (10 UI) y luego de 48 hs con hCG (gonadotrofina coriónica humana, Endocorion, Elea) (10 UI/día) para inducir la ovulación. Los dos grupos OHSS fueron inyectados con altas dosis de PMSG (50 UI/día) durante 4 días y luego de 24 hs se les inyectó hCG (25 UI). Los grupos OHSS+TRAP recibieron las mismas dosis de hormonas que los grupos OHSS más la administración del inhibidor de VEGF (TRAP: quimera recombinante Flt-1/Fc recombinante; R&D Systems Inc.) el día de la administración de hCG. Para la inhibición de VEGF, el TRAP fue administrado bajo la bursa de ambos ovarios. Los animales fueron anestesiados con Ketamina HCl (70 mg/kg; Holliday-Scott S.A., Buenos Aires, Argentina) y xilacina (5 mg/Kg; König Laboratories, Buenos Aires, Argentina). Los ovarios fueron exteriorizados realizando una incisión en la región lumbar. Los grupos OHSS+TRAP recibieron 1 µg en 5 µl PBS/0.1% BSA de TRAP bajo la bursa de ambos ovarios, mientras que los otros grupos recibieron la solución vehículo.

Las ratas se sacrificaron por decapitación 48 y 72 horas post inyección de hCG (Grupos: Control 48 y 72 h; OHSS 48 y 72 h; OHSS+TRAP 48 y 72 h) **Tabla 2**. Se extrajeron los ovarios, los cuernos uterinos, y se extrajo sangre. Los ovarios se

limpiaron, pesaron y fueron usados para los sucesivos ensayos. Uno de los ovarios se utilizó para cortes histológicos y el ovario contralateral para obtener extracto proteico para western blot. La sangre fue utilizada para obtener suero y realizar ensayos hormonales y los úteros para cortes histológicos.

**Tabla 2: Protocolo de inyección para el desarrollo del modelo OHSS en rata a partir de ratas prepúberes de 21 días de la cepa Spague Dawley.**

	Día 21	Día 22	Día 23	Día 24	Día 25	Día 26	Día 27	Día 28
<b>Control 48 h</b>			PMSG (10 UI)		hCG (10 UI)		Sacrificio	
<b>Control 72 h</b>			PMSG (10 UI)		hCG (10 UI)			Sacrificio
<b>OHSS 48 h</b>	PMSG (50 UI)	PMSG (50 UI)	PMSG (50 UI)	PMSG (50 UI)	hCG (25 UI)		Sacrificio	
<b>OHSS 72 h</b>	PMSG (50 UI)	PMSG (50 UI)	PMSG (50 UI)	PMSG (50 UI)	hCG (25 UI)			Sacrificio
<b>OHSS + TRAP 48 h</b>	PMSG (50 UI)	PMSG (50 UI)	PMSG (50 UI)	PMSG (50 UI)	hCG (25 UI) + TRAP (0,2 µg/µl)		Sacrificio	
<b>OHSS + TRAP 72 h</b>	PMSG (50 UI)	PMSG (50 UI)	PMSG (50 UI)	PMSG (50 UI)	hCG (25 UI) + TRAP (0,2 µg/µl)			Sacrificio

### **Radioinmunoensayo (RIA)**

Mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA) se determinaron en los distintos grupos experimentales, el contenido de estradiol (E<sub>2</sub>) y progesterona (P<sub>4</sub>) en suero. Se utilizaron anticuerpos policlonales en una dilución adecuada para unir el 36% del

correspondiente  $^3\text{H}$ -esteroide utilizado como trazador. En el procedimiento se incubó una alícuota de la muestra a determinar (suero), una cantidad de trazador correspondiente a 10.000 cpm y un volumen determinado de anticuerpo durante 16 horas a  $4^\circ\text{C}$ . Finalizada la incubación, se separó la hormona libre de la unida al anticuerpo con 0,2 ml de una solución de carbón activado 0,5%, en el buffer de ensayo: (Buffer RIA:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  40 mM;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  39,5 mM; NaCl 155 mM; azida sódica 0,1%; gelatina 1%; pH= 7,0) y posterior centrifugación durante 15 minutos a 3000 rpm. Los sobrenadantes fueron transferidos a viales de conteo en los cuales se agregó 2 ml de solución de centellante. La radiactividad se determinó en un contador de centelleo líquido Beckman LS 1801, con una eficiencia del 62%.

El rango de utilidad del ensayo para la  $\text{P}_4$  fue de 12,5 a 800 pg y para el  $\text{E}_2$  de 6,25 a 800 pg en un volumen final de 0,5 ml. Los valores se expresaron por ml de suero.

### **Morfología ovárica**

Los ovarios provenientes de los distintos grupos experimentales se fijaron en paraformaldehído 4% durante 12 hs. Se realizaron cortes histológicos para la tinción con hematoxilina-eosina (H&E) para el recuento de las estructuras ováricas. Secciones de 5  $\mu\text{m}$  de espesor fueron montadas a intervalos de 50  $\mu\text{m}$  en portaobjetos para evitar contar la misma estructura dos veces, de acuerdo al método descrito por Woodruff et al. [219]. Se evaluó el % de folículos atrésicos (**FAttr**), cuerpos lúteos (**CL**) y estructuras quísticas (**Q**) por sección de ovario. El % de las diferentes estructuras ováricas se determinaron en seis secciones de cada ovario (n=6 ovarios/grupo) y se expresó como % de FAttr, CL y Q/ovario. El número total de estructuras ováricas (Folículos preantrales, folículos antrales, folículos preovulatorios, FAttr, CL y Q) fue definido como el 100%. Las características morfológicas de un **FAttr** incluyen la degeneración y el desprendimiento de las células de la granulosa de la membrana basal, presencia de núcleos picnóticos en estas células y degeneración del ovocito [220;221]. Un **Q** se define como aquella estructura que contiene al ovocito rodeado de células luteales, células de la granulosa remanentes y con presencia o ausencia de glóbulos rojos.

### **Evaluación de permeabilidad vascular por extravasado de fluoresceína de sodio (NaFlu)**

Se evaluó la permeabilidad vascular en el ovario mediante el uso de fluoresceína de sodio (NaFlu) (Biopack, Argentina), un marcador inerte de bajo peso molecular, según un protocolo modificado de *Kaya y col.* (2008) [222]. Se inyectó NaFlu 10% en solución fisiológica de manera intraperitoneal (100µl/100g de peso del animal) a los seis grupos experimentales (n=6 ratas/grupo). La misma se dejó circular durante 45 minutos y luego se procedió a anestesiarse al animal con una mezcla de ketamina y xilacina (7:1 respectivamente). A continuación, se realizó una perfusión transcardíaca al animal con 40 ml de solución fisiológica para lavar el excedente intravascular de NaFlu. Se extrajeron los ovarios e inmediatamente se los procesó para criopreservar el tejido en medio de inclusión (Cryoplast®, Biopack, Argentina) hasta el momento de su utilización. Por último, se realizaron cortes histológicos de 20 µm en crióstato, los cuales fueron posteriormente analizados por microscopía confocal para evaluar el área de extravasado vascular de NaFlu como parámetro de permeabilidad vascular.

### **Técnica de inmunohistoquímica (IHO) e histoquímica**

La localización inmunohistoquímica se realizó utilizando la técnica de estreptavidina – biotina – peroxidasa. Los cortes histológicos se desparafinaron en xileno e hidrataron en concentraciones decrecientes de etanol (100%, 96% y 70%). Se bloqueó la peroxidasa endógena en 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 30 minutos. Los cortes se lavaron en buffer PBS (NaCl 0,58 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhidro 41,56 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 15,8 mM, pH 7,5). Se realizó una exposición antigénica sometiendo las muestras a microondas en buffer citrato 0,01 M (pH 6) dos veces durante cinco minutos a 600 Watt de potencia. En todos los casos se bloquearon las proteínas con 2% de BSA por 20 minutos y se incubó con el anticuerpo primario anti Caspasa-3 clivada (Biocare) (1/100), anti PCNA (Santa Cruz Biotechnology) (1/100) en PBS o con lectina biotilada BS-1 (de *Bandeiraea simplicifolia*, 20 µg/ml) toda la noche a 4° C en cámara húmeda. La lectina BS-1 es un

marcador de células endoteliales y se ha demostrado su expresión constitutiva en los diferentes estadios del desarrollo del cuerpo lúteo con similar intensidad [47;223;224].

Al día siguiente se lavó con PBS y se incubó con el correspondiente anticuerpo secundario anti – conejo 1/400 en PBS durante una hora en cámara húmeda a temperatura ambiente (excepto en el caso de la tinción con Lectina BS-1 biotinilada). Se lavó con PBS, y en todos los casos se agregó el complejo ABC: avidina-peroxidasa biotinilada (Vectastain ABC system, Vector Laboratories) y se incubó durante 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. Se lavó con PBS y se reveló con DAB (3',3-diamino bencidina) 0,5 mg/ml durante 5 minutos. Se detuvo la reacción con H<sub>2</sub>O y se realizó tinción de contraste con hematoxilina o con verde de metileno. Por último, se deshidrataron los cortes sumergiéndolos en una serie ascendente de concentraciones de etanol, se aclaró con xileno, y se montaron los cortes con medio de montaje permanente (Bálsamo de Canadá Sintético, Biopack, Argentina). Los controles negativos se obtuvieron en ausencia del anticuerpo primario.

Para evaluar la muerte y la proliferación celular en secciones ováricas, se realizó IHQ para Caspasa-3 clivada y PCNA respectivamente. Se analizaron tres campos seleccionados al azar de cada sección de ovario (6 secciones/ovario, 6 ovarios/grupo). Las células inmunopositivas fueron expresadas como “*número de células positivas para Caspasa-3 clivada/área de tejido*” o “*número de células positivas para PCNA/área de tejido*”. Las imágenes fueron digitalizadas usando una cámara (Nikon, Melville, NY, USA) montada a un microscopio de campo claro (Nikon), usando una magnificación de 400X. Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa Image J (Image Processing and Analysis in Java, National Institute of Health, USA), usando la herramienta “Cell Counter”.

Para secciones teñidas para Lectina BS-1, seis secciones ováricas fueron analizadas por ovario (6 ovarios/grupo) y tres campos seleccionados al azar de cada sección fueron fotografiadas. Las imágenes fueron convertidas a formato TIFF para su análisis usando el programa Image Pro-Plus 3.0 ® (Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA). El área vascular (células positivas para Lectina BS-1) se determinó

marcando el área positiva para Lectina BS-1 y relativizando al total del área luteal captado en la imagen.

En secciones de endometrios se determinó el índice de proliferación realizando una IHQ convencional, de la misma manera que se detalló anteriormente. Las secciones de tejido fueron incubadas con un anticuerpo primario para PCNA (1:300) (FL-261, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) a 4° C durante toda la noche. Se contaron un total de 300 células epiteliales inmunomarcadas para PCNA y se calculó el “porcentaje de células positivas para PCNA”.

### **Extracción y medición de proteínas**

Los ovarios aislados de los distintos grupos experimentales, se sometieron a una extracción de proteínas. Para esto se homogenizaron con un homogeneizador Ultra-Turrax homogenizer (IKA Werk, Breisgau, Alemania) en 600 µl de buffer de lisis (Nonidet P (NP-40) 1%, Tris 20 mM pH 8, NaCl 137 mM y glicerol 10%) suplementado con inhibidores de proteasas (PMSF 0,5 mM, N-CBZ-L-phenylalanine chloromethyl ketone 0,025 mM, N-p-tosyl-lysine chloromethyl ketone 0,025 mM and L-1-tosylamide-2-phenyl-ethylchloromethyl ketone 0,025 mM). El lisado se centrifugó a 4° C a 13.000 rpm durante 10 minutos.

Para la extracción proteica de células, las placas de 24 wells fueron congeladas a -20° C y luego se les agregó a cada well 50 µl de buffer lisis. Se las dejó reposar en hielo durante 30 minutos y se procedió a disgregar las células. El lisado se centrifugó a 4° C a 13.000 rpm durante 10 minutos.

En todos los casos, la medición de proteínas se realizó en el sobrenadante por el método de Bradford.

### **Western blot**

Para la determinación de los niveles proteicos, se sembraron 40 µg de proteínas en un gel de poliacrilamida (8%, 12% o 15%) con SDS (SDS page). Las muestras

proteicas fueron previamente hervidas durante 5 minutos en buffer (SDS 6%,  $\beta$ -mercaptoetanol 15%, glicerol 60%, azul de bromofenol 0,006%, Tris-base 0,18M, pH=6,8). Las proteínas fueron separadas por electroforesis a 25 mA durante 1,5 horas y luego fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa durante 2 horas a 80 V en buffer Tris-base 0,025M (pH=8,3), glicina 0,192 M y metanol 20%. Los sitios de unión remanentes sobre las membranas fueron bloqueados con una solución de TBS y detergente Tween (TTNBS 0,05%) y leche descremada en una concentración de 0,05 g/ml durante 1 hora a temperatura ambiente o por incubación durante toda la noche a 4°C. Luego las membranas fueron incubadas con los correspondientes anticuerpos primarios ( $\beta$ -actina: 1/3000 (sc-1616-R); PCNA: 1/200 (sc-7907), p-Akt: 1/1000 (sc-7985-R), Flt-1: 1/200 (sc-9029), KDR: 1/500 (sc-6251), Tie-2 1/200 (sc-9026), N-caderina 1/200 (sc-7939) y VE-caderina 1/100 (sc-9989) de Santa Cruz Biotechnology, Inc.; ocludina: 1/1000 (71-1500) y claudina-5: 1/2000 (35–2500) de Invitrogen; ANGPT-1: 1/1000 (ab8451), ANGPT-2: 1/200 (ab65835), p-Tie-2 (ab78142) y S1P1: 1/10000 (ab125074) de Abcam; p-VE-cadherina: 1/1000 (MAB1002), ZO-1: 1/500 (AB2272) de Milipore, p-KDR: 1/1000 (19A10), p- $\beta$ -catenina: 1/1000 (4176) y Akt: 1/500 (9277) de Cell Signalling Technology, Inc.) en TBS durante toda la noche a 4° C y luego de sucesivos lavados con TTNBS, las membranas fueron incubadas con sus correspondientes anticuerpos secundarios acoplados a la enzima peroxidasa (IgG anti conejo acoplado a peroxidasa 1:1000 o IgG anti ratón acoplado a peroxidasa 1:1000 diluidos en TTNBS 0,1%) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se detectó la marca por quimioluminiscencia y se utilizó una película radiográfica. El contenido proteico se analizó en las distintas muestras mediante la realización de una densitometría de las bandas obtenidas para la proteína de interés utilizando el programa Scion Corporation. La densidad de cada banda fue normalizada respecto a la densidad obtenida para la proteína  $\beta$ -actina en la misma muestra. En el caso del análisis proteico en fluidos foliculares humanos se normalizó con la banda invariable obtenida de las membranas de nitrocelulosa teñidas con S-Ponceau.

### *Análisis histológico de los endometrios*

Los cuernos uterinos fueron fijados en formaldehído 10% por dos días y embebidos en parafina y un grupo de secciones fueron teñidas con H&E. Un médico patólogo con experiencia ginecológica examinó microscópicamente los cortes y realizó un análisis histológico de los endometrios.

### *Pacientes y obtención de fluido folicular (FF)*

El material humano fue provisto por el centro de reproducción *PREGNA Medicina Reproductiva* (Director: Dr. Ignacio de Zúñiga), previo consentimiento informado y firmado de las pacientes. La utilización de este material biológico ha sido aprobada por el Comité de Ética del IBYME.

Se excluyeron las pacientes con patologías pélvicas tales como endometriosis, fibromas uterinos, enfermedad inflamatoria pélvica. Durante el ciclo de estimulación ovárica, cuando los folículos alcanzan 17 mm de diámetro, se les inyecta a las pacientes hCG (5000 UI/ml Pregnyl®, Organon SA). La recuperación ovocitaria (RO) se realiza vía vaginal con una guía de ultrasonido 34 h horas post inyección hCG. Durante la RO, sólo se extrae el fluido (FF) de folículos entre 16 y 20 mm. Se junta el FF de todos los folículos de la paciente. Sólo aquellos FF macroscópicamente claros, que no evidencian contaminación, y aquellos que no presentan sangre son considerados para el estudio. Luego de la aplicación de las técnicas de fertilización asistida y de la aspiración folicular, se separan los ovocitos para su fertilización y los FF, en vez de ser descartados, son derivados a nuestro laboratorio. Los FF se centrifugan y se almacenan a -80° C hasta ser utilizados en los distintos ensayos.

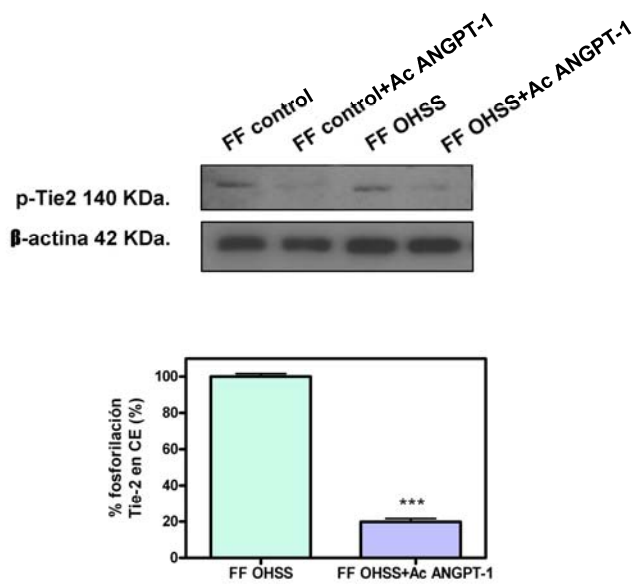
Se utilizaron los FF provenientes de pacientes con alto riesgo a desarrollar el OHSS (**Grupo: FF OHSS, n=19**) y pacientes controles sin riesgo a desarrollar OHSS (con ciclos menstruales regulares y sin evidencias de endocrinopatías) (**Grupo: FF Control, n=20**). El criterio de selección de una paciente con riesgo a desarrollar OHSS



fue: > 20 ovocitos recuperados/ciclo de estimulación ovárica y niveles de E<sub>2</sub> séricos el día de la administración de hCG > 3000 pg/ml.

### **Neutralización de ANGPT-1 presente en el FF**

Para la inmunoneutralización de la ANGPT-1 en los FF, se incubaron con un anticuerpo neutralizante (ab49694, Abcam, UK) en una relación molar de 1000:1 anticuerpo:[ANGPT-1 en FF OHSS] e incubados 1 hora a 37° C [152]. Este anticuerpo no muestra reacción cruzada con Angiopoyetina-2 recombinante humana. Como control negativo se utilizó IgG anti humana (ab77118, Abcam, UK). Con el fin de confirmar la eficiencia de neutralización, realizamos un Western blot para detectar la forma fosforilada del receptor de ANGPT-1, Tie-2 (ab78142, Abcam). Este anticuerpo reconoce Tie-2 sólo cuando se encuentra fosforilado en Tyr992 (phospho Y992). Esta fosforilación regula la proliferación celular, la migración y la diferenciación de las células endoteliales durante la formación de nuevo vasos [225-227]. El pretratamiento con anticuerpo anti ANGPT-1 en ambos FF de pacientes control y pacientes con riesgo a desarrollar OHSS resultó en un 80% de la inhibición de fosforilación de Tie-2 ( $p < 0,001$ ) (**Fig. 10**).



**Figura 10. Inhibición de ANGPT-1 en FF.** Porcentaje de fosforilación de Tie-2 en células endoteliales (CE) incubadas con FF de pacientes control y OHSS preincubado con un anticuerpo neutralizante anti ANGPT-1 (Ac ANGPT-1) en una relación molar 1000:1 => anticuerpo:[ANGPT-1 en FF OHSS]. Se logró un 80% de inhibición de la activación del receptor Tie-2 ( $p < 0,001$ ).

### Cultivo primario de células de granulosa-luteínicas humanas (CGLs)

Las células de la granulosa luteínicas humanas (CGLs) fueron obtenidas a partir de los FF como se mencionó anteriormente. Los aspirados foliculares de cada paciente se centrifugaron a 400g durante 10 minutos. Luego de remover el sobrenadante, el pellet conteniendo CGLs y glóbulos rojos fue resuspendido en 1 ml de medio DMEM:F12 (1:1 vol/vol) conteniendo 10 mM HEPES suplementado con fungizona (250 lg/ml) y gentamicina (10 mg/ml) (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) en tubos estériles de 50 ml y centrifugado a 180g durante 5 minutos. El pellet resuspendido se colocó cuidadosamente sobre un colchón de Percoll (densidad= 1,085; 3 ml Percoll/ml suspensión celular) (Sigma–Aldrich, MO, USA) en un tubo estéril de 15 ml y centrifugado a 600g durante 30 minutos. Las CGLs fueron aspiradas de la interfase y resuspendidas en 5 ml de buffer lisis ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,15 M;  $\text{KHCO}_3$  10 mM;

Na<sub>2</sub>EDTA 0,1 mM) durante 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar los glóbulos rojos. Luego se centrifugó a 180g durante 5 minutos.

Las CGL se contaron en cámara de Neubauer y se plaquearon en placas de 24 wells a una densidad de  $3 \times 10^5$  células/well previamente cubiertos con colágeno y se incubaron durante 48 hs en medio de cultivo con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Natocor, Argentina). Luego las CGLs se lavaron e incubaron en medio sin suero suplementado con hCG (Endocorion, Ellea, 1 IU/ml) [228]. Después de 48 h, se añadió buffer lisis y los extractos de proteicos se almacenaron a -20 ° C hasta su uso en experimentos posteriores.

### **Medición de los niveles de ANGPT-1, ANGPT-2 y s-Tie-2**

Los niveles de ANGPT-1 y su receptor soluble s-Tie-2 en FF fueron analizados con kits de ELISA comercial (Quantikine; R&D Systems Inc., Minneapolis, MN). Los coeficientes de variación intra-ensayo e inter-ensayo fueron 11,5% y 18% para ANGPT-1, y 9% y 8% para s-Tie-2, respectivamente.

### **Cultivo de células endoteliales**

Para todos los ensayos de angiogénesis in vitro se utilizó la línea celular endotelial EA.hy926, la cual fue donada por el Dr. Gareth Owen (Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile). Esta línea celular fue reportada por el Dr. Cora-Jean S. Edgell de la Universidad de Carolina del Norte, Chapell Hill, Carolina del Norte, EE.UU. Se obtuvo mediante la hibridación de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) con la línea celular de carcinoma de pulmón humano A549/8. Las células EA.hy926 mantienen el fenotipo de células endoteliales y presentan funciones altamente diferenciadas del endotelio vascular humano. Además, esta línea endotelial se caracteriza por su inmortalidad, estabilidad a través del número de pasajes y reproducibilidad de los resultados [229;230]. Más específicamente, las

células EA.hy926 expresan endotelina-1, los cuerpos de Weibel-Palade, prostaciclina, antígeno relacionado con el factor VIII, moléculas de adhesión endotelial ICAM-1 y VCAM-1, que son características de un cultivo primario de células endoteliales [229-235].

Las células EA.hy926 se mantuvieron en medio Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Invitrogen Corp., CA, USA) con 10 % SFB en presencia de 100 U/ml penicilina G y 100 mg/ml estreptomina sulfato a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. Las células EA.hy926 cells se recuperaron por tripsinización (Tripsina-EDTA (0,25%), Gibco, Life Technologies), se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 min y se resuspendieron en el mismo medio para ser utilizadas en los sucesivos ensayos.

### **Ensayo de migración por herida**

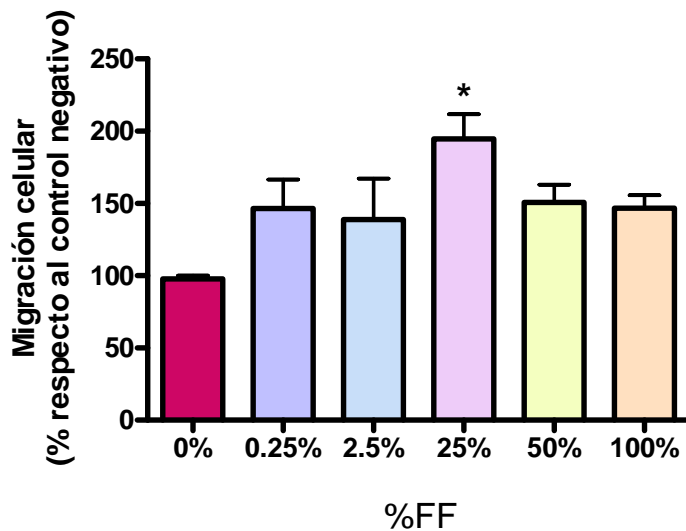
Se sembraron las células EA.hy926 en placas de 24 wells y se crecieron hasta alcanzar un 100% de confluencia. Previo a la estimulación, se sincronizó el ciclo celular manteniendo a las células en medio sin suero durante 16 horas para evitar que las células proliferen. El tiempo de duplicación de las células EA.hy926 es de 25 horas [236].

Se realizó una curva de concentración de FF a utilizar y se estableció el tiempo de migración. Con 25 % de FF como estímulo se obtuvo la mayor viabilidad celular y a las 15 horas se logró la máxima migración celular sin que las heridas se cierren (**Fig. 11**).

Se realizó una herida por well utilizando un tip de micropipeta de 200ul como lo describe Savani RC y col. (1995) [237]. Posterior a la herida, el cultivo celular se lavó con DMEM sin suero, se fotografió bajo un microscopio invertido (tiempo= 0 h). Se agregó a cada well los estímulos:

**A)** 25% FF en DMEM de las distintas pacientes con y sin anticuerpo neutralizante anti-ANGPT-1.

**B)** 25% FF en DMEM de las distintas pacientes con el agregado del esfingolípido S1P (S-9666, Sigma-Aldrich) (0,05  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M y 0,2  $\mu$ M). Estos tratamientos se mantuvieron por 15 h a 37° C y se fotografió nuevamente (tiempo= 15 h). Se capturaron imágenes pertenecientes al mismo sector fotografiado en el tiempo 0 hs. El resultado se expresó como % de migración celular (área tiempo 0 h – área tiempo 15 h) respecto al control negativo (migración basal de las células en medio sin suero). Para la cuantificación se utilizó el programa Image J (NIH).



**Figura 11.** Curva de concentración de FF en el ensayo de migración por herida. Migración de células endoteliales en presencia de 0; 0,25; 2,5; 25; 50 y 100% de FF de pacientes control a las 15 horas. Con 25 % de FF como estímulo se obtuvo la mayor viabilidad celular y a las 15 horas se logró la máxima migración celular sin que las heridas se cierren. \*  $P < 0,05$ .

### Visualización de filamentos de actina

Se evaluó la integridad del citoesqueleto por visualización de los filamentos de actina por medio de faloidina marcada con TRITC [193;238]. Las células EA.hy926 crecidas a 100% de confluencia se incubaron con los estímulos correspondientes:

- A) 24 hs en presencia de FF con y sin anticuerpo neutralizante anti- ANGPT-1.
- B) 24 hs en presencia de FF y luego 30 minutos de S1P (0,1  $\mu$ M).

Pasado este tiempo, se fijaron con paraformaldehído 4% durante 20 min. Luego se lavaron con PBS, se deshidrataron en acetona 10 min y se permeabilizaron con una solución 0,1% Triton X-100-PBS durante 10 min. Por último, las células fueron teñidas con 50 ug/ml de faloidina-TRITC (P1951, Sigma-Aldrich) durante 40 min. Se lavaron y se montaron con el medio de montaje para fluorescencia Vectashield (H-1000, Vector Laboratories) para ser observadas en un microscopio confocal.

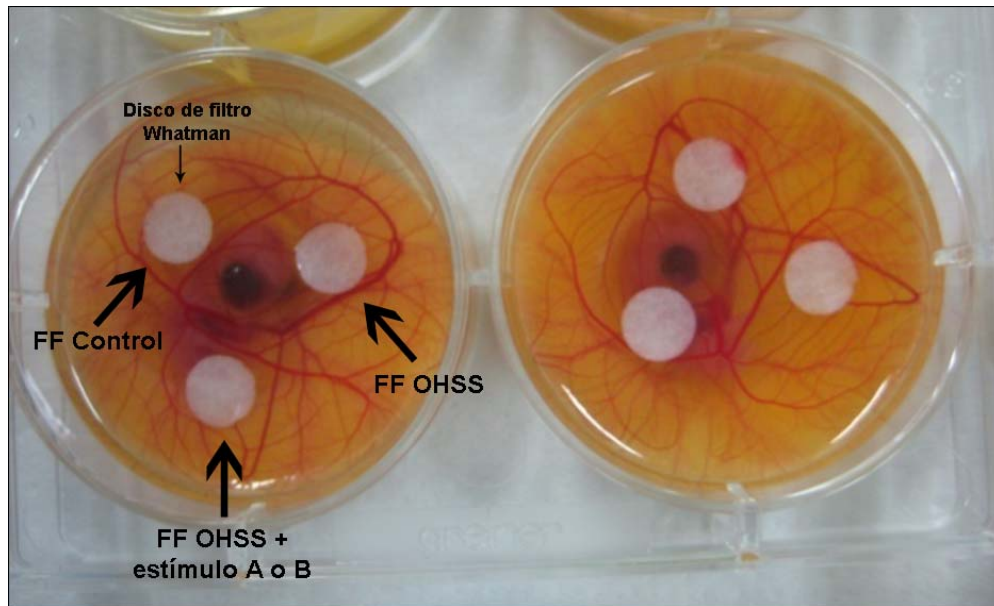
### **Ensayo de angiogénesis in vivo: membrana corionalantoide de embrión de codorniz (CAM)**

Se utilizaron huevos de codorniz japónica fecundados. Los mismos se incubaron *in ovo* durante 2 días a 38° C y 60% de humedad relativa. El desarrollo *ex ovo* se realizó siguiendo la metodología descrita por Parsons-Wingerter y col. (1998) [239]. Luego de los 5 días de incubación *ex ovo* se colocaron los estímulos:

- A) FF de las distintas pacientes con y sin anticuerpo neutralizante anti ANGPT-1 durante 48 h.
- B) FF de las distintas pacientes más el agregado de S1P (0,1  $\mu$ M) durante 24 h.

Los estímulos se colocaron embebidos en discos de filtro Whatman de 5 mm de diámetro (**Fig. 12**). Luego del tiempo de estimulación, los embriones fueron sacrificados en frío (-20° C) durante 2 h. Para el análisis histomorfométrico del plexo capilar, se fijaron las CAM en solución 4% paraformaldehído/ 2% glutaraldehído en PBS durante 30 minutos. Las CAM fueron removidas del embrión y colocadas en portaobjetos.

La angiogénesis se evaluó mediante la cuantificación del número de ramificaciones vasculares en toda el área delimitada por el disco bajo una lupa estereoscópica (30X; Leica Camera, Solms, Alemania) utilizando el programa Image J (NIH).



**Figura 12. Ensayo CAM.** La imagen muestra una porción de una placa de seis wells en la cual se colocan las CAM. Los estímulos se ubican sobre el plexo capilar embebidos en discos de filtro Whatman de 5 mm de diámetro.

### Niveles de integrina $\alpha\beta3$ medidos por ELISA

Los niveles endógenos de expresión de la integrina  $\alpha\beta3$  (marcador selectivo de tejido vascular angiogénico) [240-242], se determinaron mediante un ensayo de ELISA en las CAM incubadas con FF de ambos grupos de pacientes con y sin el agregado del anticuerpo neutralizante anti ANGPT-1 (Brooks *et al.* 1994; Eliceiri *et al.* 1998; Avraamides *et al.* 2008). Las secciones de las CAMs confinadas por los discos de filtro fueron removidas y homogeneizadas en PBS. Cada well de una placa de 96 wells fue

cubierto por triplicado con 10 µg de proteínas de las CAMs previamente analizado por Bradford. La placa fue secada a 37°C, bloqueada en 5% BSA e incubada con el anticuerpo anti-integrina  $\alpha v\beta 3$  (1/1000) (LM609 -177 Millipore Corp., MA, USA), durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego, los wells se lavaron con PBS y se incubaron con un anticuerpo anti-ratón IgG unido a porixidasa (Sigma-Aldrich Co., MO, USA) durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se reveló con 3,3',5,5'-tetrametil-benzidina (Sigma-Aldrich Co.). La placa se leyó a 492 nm en un lector de ELISA. Los valores se expresaron como densidad óptica (DO).

### **Co-localización del factor VW y de $\alpha$ -SMA en el plexo capilar de la CAM por inmunofluorescencia**

Las CAM fueron fijadas con una solución 4% paraformaldehído en PBS durante 30 min. Luego se cortaron las áreas confinadas por los disco de filtro y se las colocaron en pocillos de placas de 12 wells. Las CAM se permeabilizaron con una solución 1% BSA, 0,1% Tritón 100X, 0,05% Tween 20 en PBS (pH 7.2) durante toda la noche a 4° C. Luego, se lavaron y se incubaron con el primer anticuerpo primario anti-Factor VW (1/200) (A0082 Dako) 18 h durante toda la noche. Al día siguiente se agregó el segundo anticuerpo primario anti- $\alpha$ -SMA de músculo liso (1/250) (ab18147 Abcam) 24 h a 4° C. Las CAM se lavaron y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes (Anti-conejo conjugado a FITC (1/1000) 81-6111 Zymed y anti-ratón Dylight®549 (1/1000) DI-2549, Vector Laboratories) cada uno 2 horas a temperatura ambiente.

Se lavaron, se colocaron en portaobjetos y se montaron con glicerol/PBS (1:1) para ser observadas en un microscopio confocal.



### **Tratamiento estadístico de los datos**

Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) de los valores obtenidos en el total de los experimentos realizados. Para el caso de los estudios con animales, los resultados obtenidos fueron de al menos cuatro experimentos usando 6 ratas por grupo. Para el caso de los estudios con células todos los experimentos fueron realizados por triplicado y se realizaron al menos tres experimentos independientes usando FF de 20 pacientes control y 19 pacientes con riesgo a desarrollar OHSS.

Las comparaciones estadísticas entre los grupos se realizaron utilizando:

**Capítulo I: Efecto de la inhibición in vivo de VEGF en un modelo OHSS desarrollado en rata:** Análisis de Varianza (ANOVA), seguido por el test de Tuckey.

**Capítulo II: Efecto de la inhibición de ANGPT-1 en FF de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS:**

- A) Medición del sistema de ANGPTs/Tie-2 en el modelo OHSS desarrollado en rata, en FF humano y en CGL: test *t* de Student para muestras independientes no paramétricas.
- B) Células endoteliales: Análisis de Varianza (ANOVA), seguido por el test de Tuckey.

**Capítulo III: Efecto del SIP en FF de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS:** Análisis de Varianza (ANOVA), seguido por el test de Dunnett's.

Para el análisis estadístico de todos los datos se utilizó el programa de estadística GraphPad Prism v5.0. Valores de probabilidad menores que 0,05 fueron considerados significativos.

# RESULTADOS

## **CAPÍTULO I: Efecto de la inhibición *in vivo* de VEGF en un modelo de OHSS desarrollado en rata**

La presencia de moléculas vasoactivas en respuesta a la administración de hCG es la característica más importante del desarrollo de OHSS en mujeres, y el VEGF es el mediador más estudiado en estas pacientes. En la primera parte de esta tesis, se evaluó el efecto de la inhibición local de VEGF sobre el desarrollo luteal, la formación de estructuras quísticas, la esteroidogénesis, la apoptosis, la proliferación y la angiogénesis en ovarios del modelo OHSS desarrollado en rata. Se utilizó como inhibidor de la angiogénesis una quimera denominada TRAP que consta de un dominio extracelular del receptor 1 de VEGF (Flt-1) y una región Fc de una inmunoglobulina humana.

### ***1.10. Medición del peso ovárico y niveles de hormonas esteroideas***

El efecto de la inhibición de VEGF en el peso ovárico y los niveles de hormonas esteroideas en suero se muestra en la **Tabla 3**. El peso de los ovarios en el grupo OHSS fue significativamente mayor que en el grupo control a ambos tiempos analizados ( $p < 0,05$ ). A las 72 h, la administración del inhibidor TRAP disminuyó significativamente el peso ovárico comparado al grupo OHSS sin tratar ( $p < 0,05$ ).

A las 48 y 72 h luego de la inyección de hCG, la concentración de  $E_2$  sérico aumentó significativamente comparado al grupo control ( $p < 0,05$ ). Luego de las 48 h, el tratamiento con TRAP disminuyó de manera significativa los niveles de  $E_2$  y  $P_4$  comparado al grupo OHSS sin tratar ( $p < 0,05$ ), mientras que a las 72 h, el tratamiento con TRAP disminuyó los niveles de  $E_2$  comparado al grupo OHSS sin tratar ( $p < 0,05$ ).

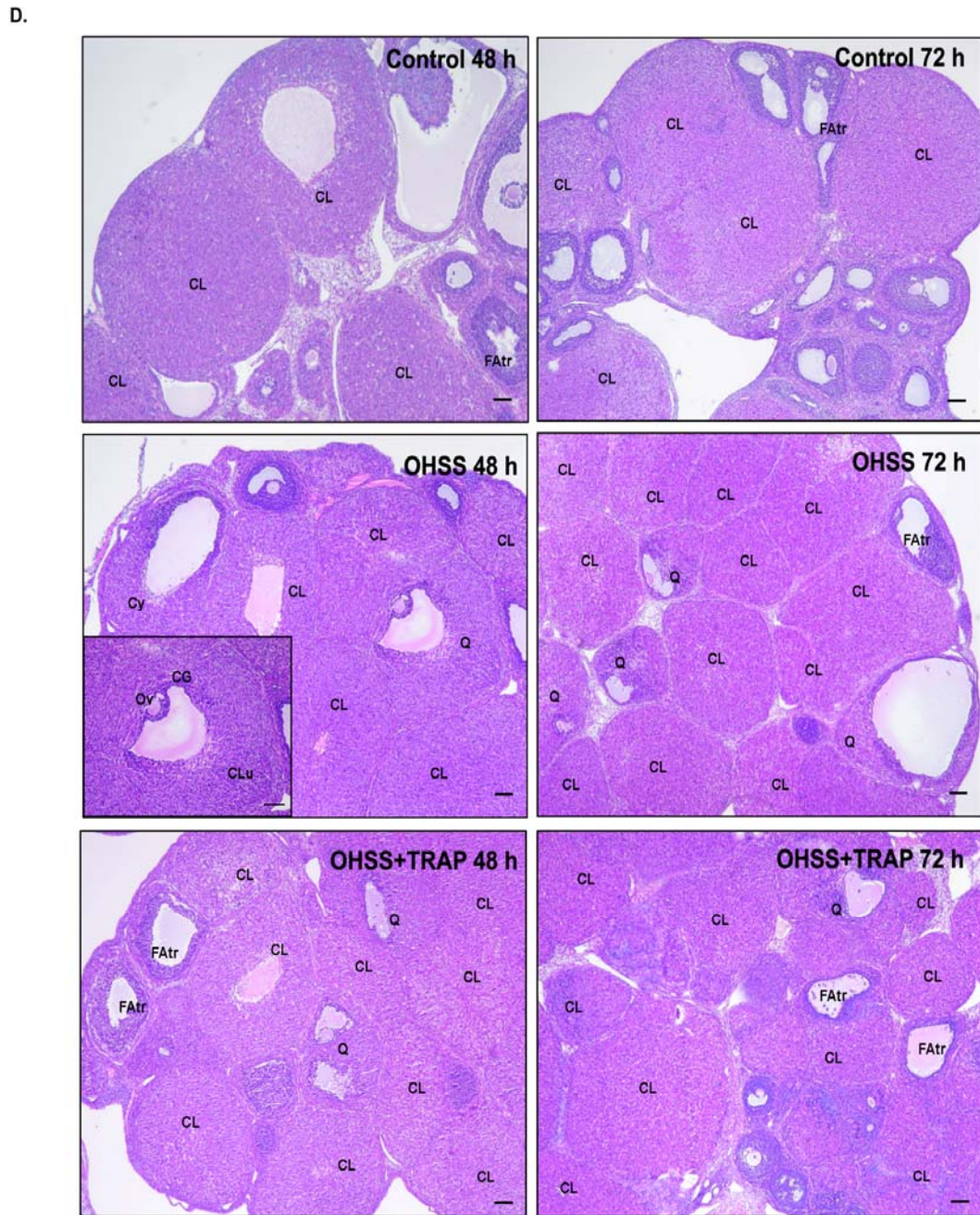
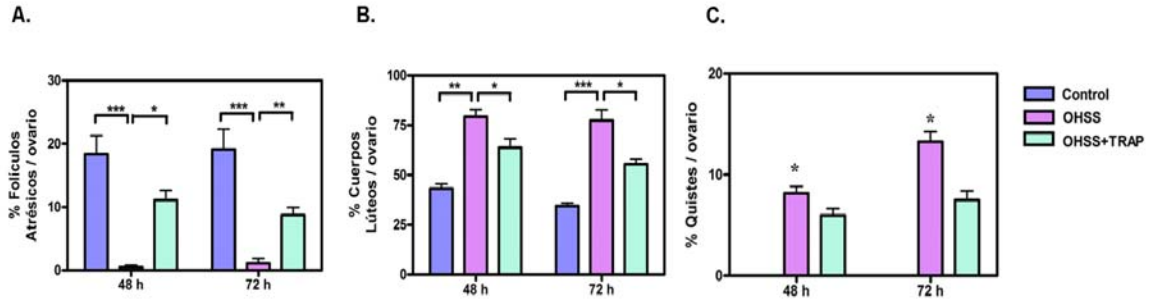
**Tabla 3. Efecto in vivo de la inhibición de VEGF sobre el peso ovárico y los niveles de las hormonas esteroideas en suero en un modelo de OHSS desarrollado en rata.**

	Control 48h (n=6)	OHSS 48h (n=6)	OHSS+ TRAP 48h (n=6)	<i>p</i>	Control 72h (n=6)	OHSS 72h (n=6)	OHSS+ TRAP 72h (n=6)	<i>p</i>
<b>Peso ovárico (g)</b>	0,132 ± 0,013	0,217 ± 0,009 *	0,208 ± 0,009 *	*< 0,05	0,125 ± 0,006	0,221 ± 0,009 *	0,185± 0,003	*< 0,05
<b>Estradiol sérico (ng/ml)</b>	0,356 ± 0,058	0,790 ± 0,110 *	0,415 ± 0,120	*< 0,05	0,149± 0,005	0,280 ± 0,030 *	0,130± 0,035	*< 0,05
<b>Progesterona sérica (ng/ml)</b>	133,00 ± 45,46	389,20± 48,36 *	243,30 ± 28,52	*< 0,05	100,90 ± 12,04	421,30± 59,70 *	399,90± 78,01 *	*< 0,05

Los datos están expresados como la media ± SEM; n = 6 ratas/grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa entre los grupos del mismo tiempo utilizando ANOVA de una vía, seguido por prueba de comparación múltiple de Tukey.

### 1.2. Morfología ovárica

Para estudiar el efecto causado por el tratamiento de TRAP en el modelo de OHSS en rata sobre la morfología ovárica, secciones histológicas de ovarios se tiñeron con H&E para determinar el porcentaje de folículos atrésicos (**FAttr**), cuerpos lúteos (**CL**) y quistes (**Q**) por ovario (**Fig. 13**). Tanto a las 48 h como a las 72 hs, el tratamiento con TRAP aumentó de manera significativa el porcentaje de **FAttr** comparado al grupo OHSS sin tratar (48 h:  $p < 0,05$ ; OHSS 72 h:  $p < 0,01$ ). El porcentaje de **CL** en el grupo OHSS fue significativamente mayor respecto a ovarios de ratas control (48 h:  $p < 0,01$ ; 72 h:  $p < 0,001$ ). Además, observamos que el tratamiento con TRAP disminuyó el porcentaje de **CL** respecto al grupo OHSS sin tratar a las 48 h y 72 h ( $p < 0,05$ ). A ambos tiempos estudiados, la inhibición de VEGF redujo significativamente el porcentaje de **Q** en el grupo OHSS comparado al grupo sin tratar ( $p < 0,05$ ).

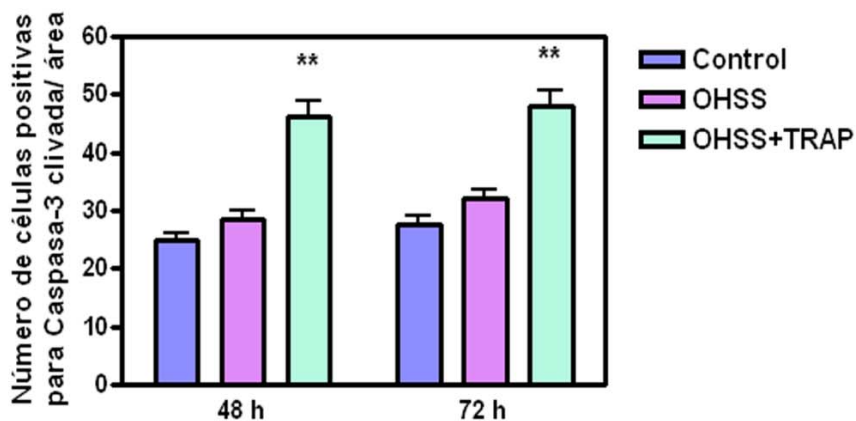


**Figura 13. Efecto de la inhibición del VEGF sobre la morfología ovárica en un modelo de OHSS desarrollado en rata.** Secciones histológicas fueron teñidas con H&E. Secciones de 5  $\mu\text{m}$  fueron montadas a intervalos de 50  $\mu\text{m}$  sobre portaobjetos para evitar contar la misma estructura dos veces. Se contaron los cuerpos lúteos (CL) y las estructuras quísticas (Q). Los quistes se definieron como estructuras con presencia del ovocito rodeados por células luteales, remanente de células de la granulosa y glóbulos rojos. Se analizaron los campos seleccionados al azar de cada sección de ovario (6 secciones / ovario,  $n = 6$  ovarios / grupo) y se expresaron como (A) porcentaje de FAtr/ovario (B) porcentaje de CL/ovario o (C) porcentaje de Q/ovario. Los datos están expresados como la media  $\pm$  SEM (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). (D) Campos representativos de secciones de ovario teñidos con H&E en los seis grupos experimentales. Magnificación original 100X. El recuadro muestra un quiste, magnificación 400X. Las barras de escala corresponden a 50  $\mu\text{m}$ . FAtr: folículo atrésico; CL: cuerpo lúteo; Q: quiste Ov: ovocito; CG: células de la granulosa; CLu: células luteales.

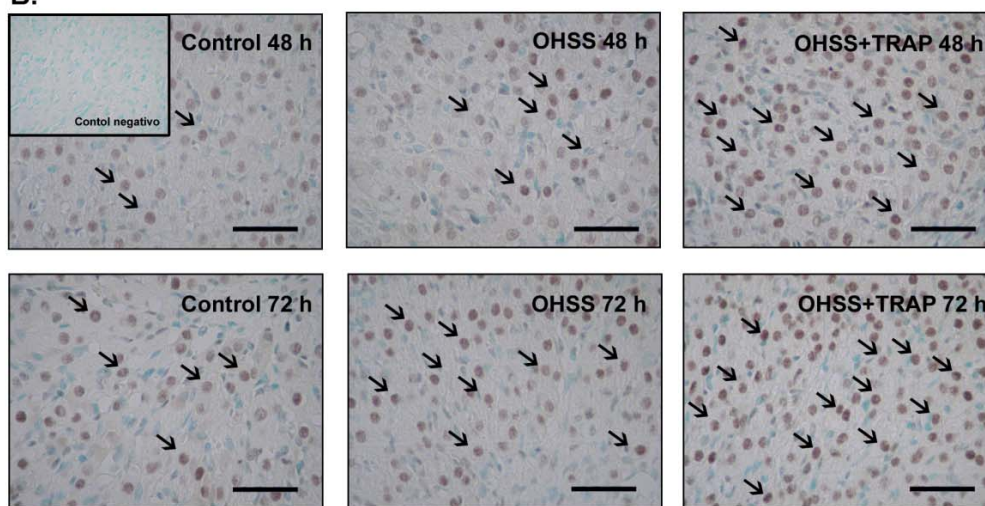
### **1.3. Efecto de la inhibición de VEGF sobre la luteólisis**

Debido a que la luteólisis involucra la involución del CL y la pérdida gradual de células por apoptosis, se evaluó este tipo de muerte mediante IHQ para caspasa-3 clivada (forma activa), cuantificando el número de células positivas por área luteal [243]. (**Fig. 14**). El tratamiento con TRAP aumentó el número de células inmunomarcadas para Caspasa-3 clivada comparado al grupo OHSS sin tratar en ambos tiempos (48 y 72h) ( $p < 0,01$ ). No se observaron diferencias entre los grupos control y OHSS.

A.



B.

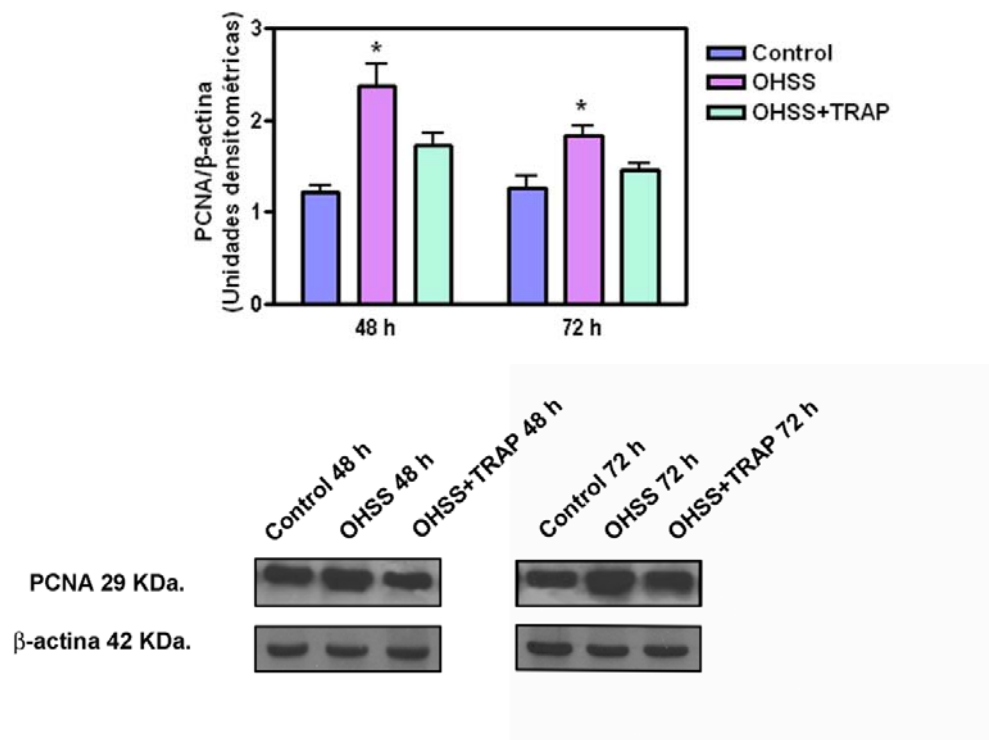


**Figura 14.** Efecto de la inhibición de VEGF sobre la expresión de Caspasa-3 clivada en CL en un modelo de OHSS desarrollado en rata. (A) La expresión de la Caspasa-3 clivada fue determinada contando las células inmunomarcadas en CL en secciones a 400X en campos seleccionados al azar. Los datos están expresados como la media  $\pm$  SEM. Se analizaron 3 campos por CL, 6 secciones por ovario y 6 ovarios por grupo (\*\*  $p < 0,01$ ). (B) Campos representativos de secciones de ovarios teñidos con anticuerpo anti Caspsa-3 clivada en los seis grupos experimentales. Las flechas muestran núcleos positivos. Magnificación 400X. Las barras de escala corresponden a 50  $\mu$ m.



#### 1.4. Efecto de la inhibición de VEGF sobre la proliferación celular

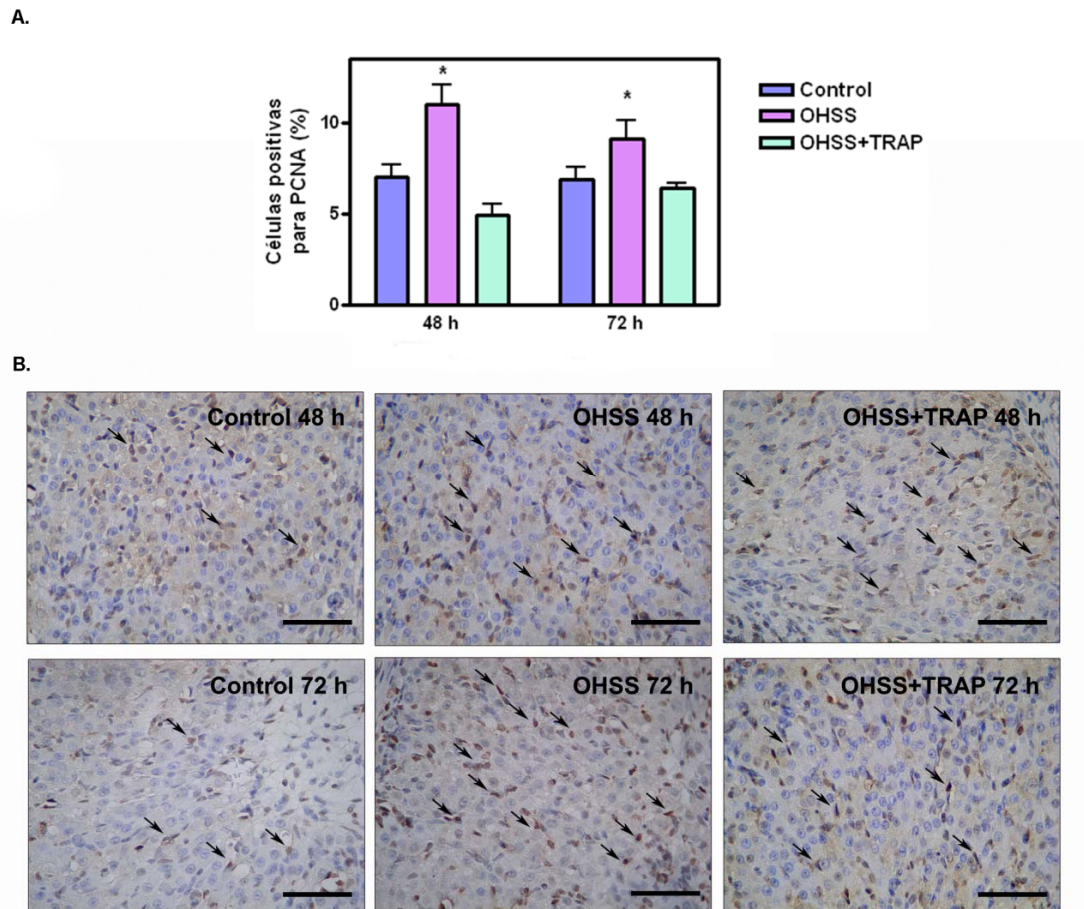
Con el objetivo de analizar si la inhibición de VEGF tiene efecto sobre la proliferación celular, evaluamos los niveles de PCNA ováricos por Western blot (**Fig. 15**). Los resultados mostraron un aumento de los niveles de PCNA en ovarios de ratas OHSS comparado a ratas control a ambos tiempos analizados (48 h:  $p < 0,05$ ; 72 h:  $p < 0,05$ ). Por otro lado, el TRAP disminuyó la expresión de PCNA luego de 48 y 72 h de tratamiento comparado a las ratas OHSS sin tratar ( $p < 0,05$ ).



**Figura 15. Efecto de la inhibición de VEGF sobre la proliferación ovárica en un modelo OHSS desarrollado en rata. Cuantificación densitométrica de PCNA. La densidad óptica se expresó como unidades arbitrarias  $\pm$  SEM normalizada a la  $\beta$ -actina ( $n=6$ /grupo, \*  $p < 0,05$ ). Immunoblots representativos para la expresión de PCNA se muestran en el panel inferior.**



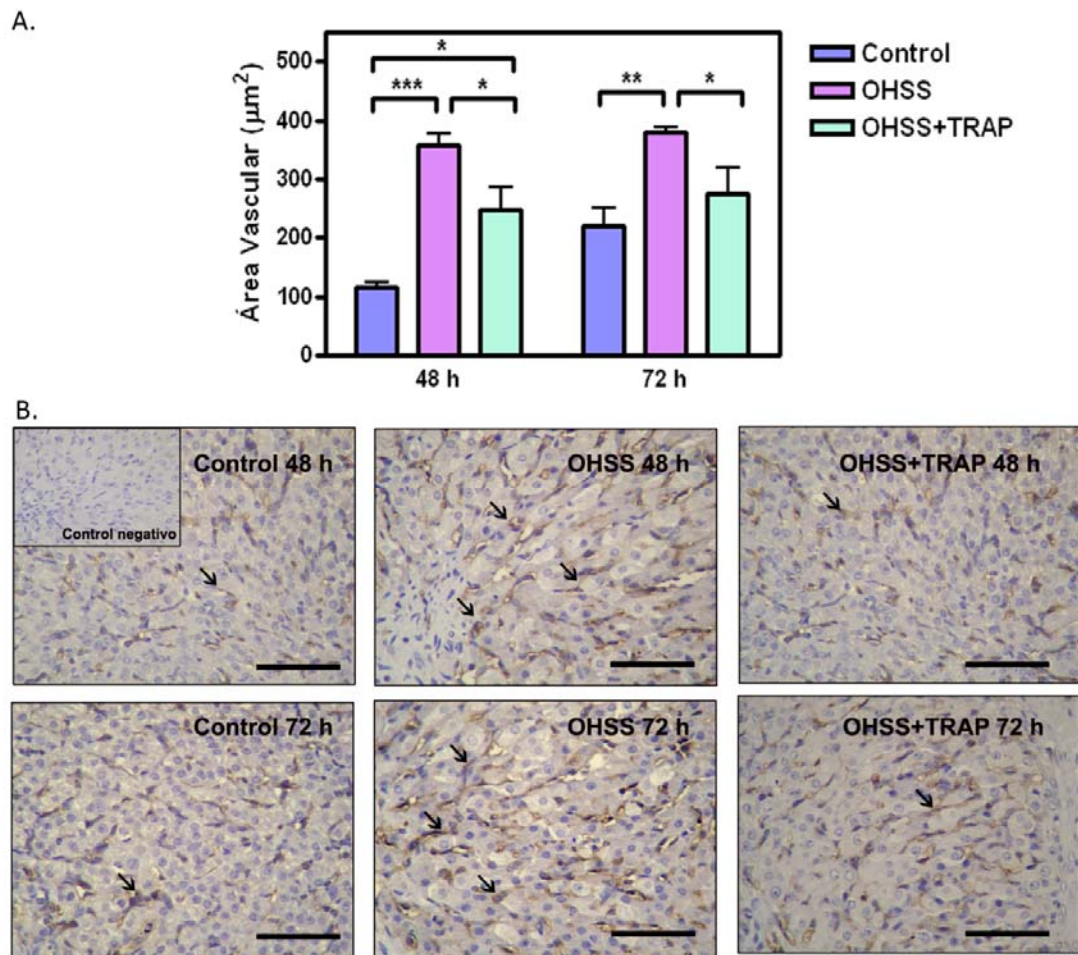
Estos resultados fueron corroborados realizando una inmunohitoquímica para PCNA en CL ( $p < 0,05$ ) (**Fig. 16**).



**Figura 16.** Efecto de la inhibición de VEGF sobre la expresión de PCNA en CL en un modelo de OHSS desarrollado en rata. **(A)** La expresión de PCNA fue determinada contando las células inmunomarcadas en CL en secciones a 400X en campos seleccionados al azar. Los datos están expresados como la media  $\pm$  SEM. Se analizaron 3 campos por CL, 6 secciones por ovario y 6 ovarios por grupo ( $* p < 0,05$ ). **(B)** Campos representativos de secciones de ovarios teñidos con anticuerpo anti PCNA en los seis grupos experimentales. Las flechas muestran núcleos positivos. Magnificación 400X. Las barras de escala corresponden a 50  $\mu$ m.

### 1.5. Efecto de la inhibición de VEGF sobre el desarrollo vascular

Para evaluar si la inhibición de VEGF afectaba la densidad de células endoteliales, realizamos una marcación histoquímica para Lectina BS-1 en secciones de ovarios y se cuantificó como área vascular ( $\mu\text{m}^2$ ) (**Fig. 17**). La figura muestra un aumento del área vascular en CL del grupo OHSS comparado al grupo control (48 h:  $p < 0,001$ ; 72 h:  $p < 0,01$ ). Por otro lado, la inhibición de VEGF disminuyó el área vascular en CL del grupo OHSS comparado al grupo OHSS sin tratamiento (48 h:  $p < 0,05$ ; 72 h:  $p < 0,05$ ).



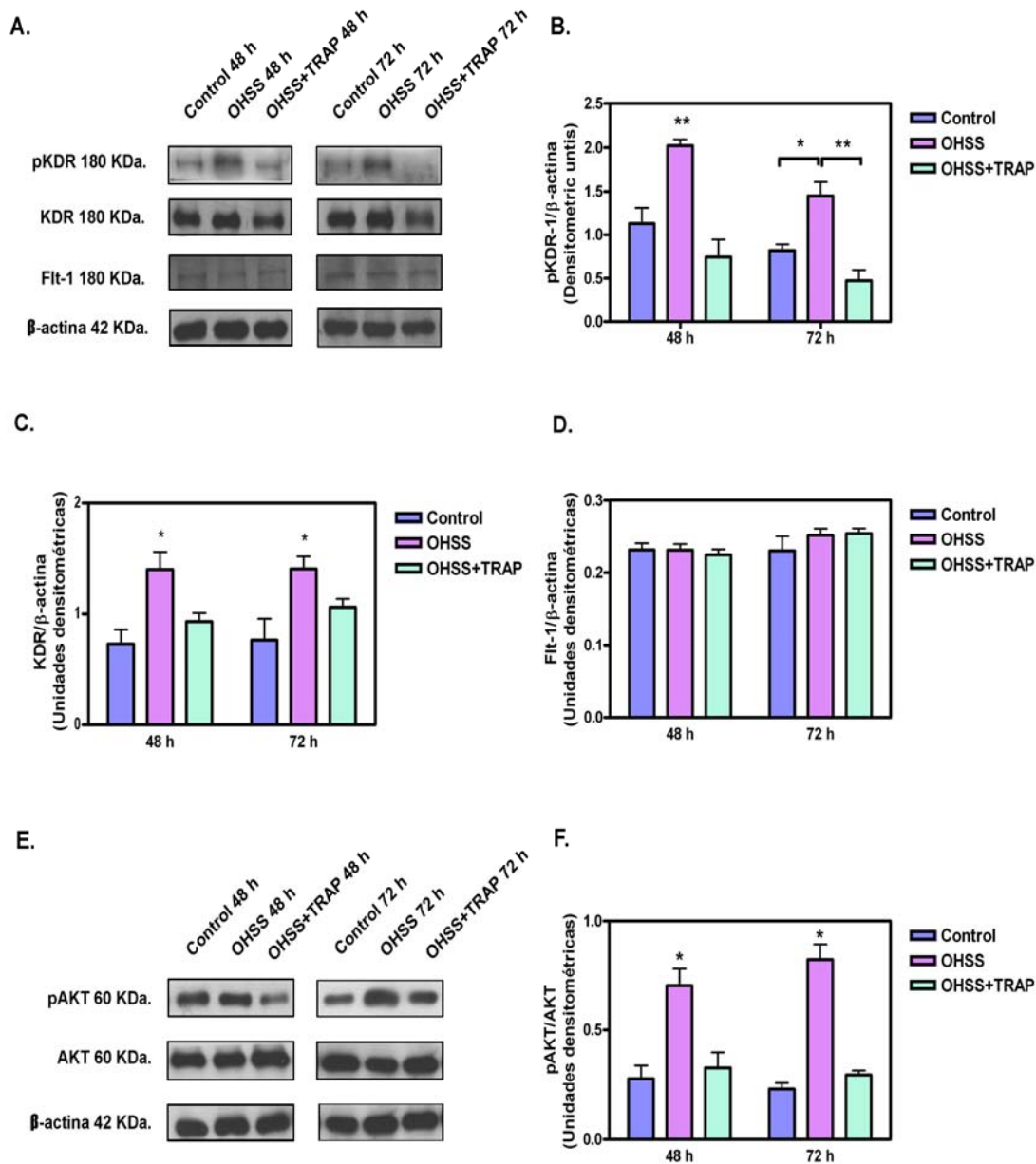
**Figura 17.** Efecto de la inhibición de VEGF sobre las células endoteliales en un modelo de

**OHSS desarrollado en rata. (A)** Cuantificación del área vascular en CL medida por histoquímica para Lectina. Se analizaron 3 CL por ovario, 6 secciones por ovario y 6 ovarios por grupo (\*  $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ ). **(B)** Campos representativos de secciones de ovarios teñidos con Lectina conjugada a Biotina en los seis grupos experimentales. Las flechas muestran marca positiva. Magnificación 400X. Las barras de escala corresponden a 50  $\mu\text{m}$ .

### **1.6 Efecto de la inhibición de VEGF sobre la expresión de sus receptores y la expresión de pAKT/AKT.**

Debido a que el VEGF ejerce sus acciones en la célula a través de sus 2 principales receptores, KDR y Flt-1, se decidió evaluar el efecto del TRAP sobre la expresión de los mismos (**Fig. 18**). Los resultados mostraron que en ovarios de ratas del grupo OHSS a las 48 y 72 h existe un aumento significativo de la expresión de KDR y su forma fosforilada, pKDR, comparado a ovarios de ratas controles (KDR: 48 h:  $p<0,05$ ; 72 h:  $p<0,05$ ; pKDR: 48 h:  $p<0,05$ ; 72 h:  $p<0,01$ ). Sin embargo, la administración de TRAP revirtió este efecto comparado a ratas OHSS sin tratar (KDR: 48 h:  $p<0,05$ ; 72 h:  $p<0,05$ ; pKDR: 48 h:  $p<0,01$ ; 72 h:  $p<0,01$ ) (**Fig. 18 B y C**). No se encontraron diferencias significativas en la expresión de Flt-1 entre los distintos grupos experimentales (**Fig. 18D**).

Para evaluar si la inhibición de VEGF afecta la vía de señalización de los receptores de VEGF en ovarios de ratas OHSS, medimos por Western blot la forma fosforilada de AKT en los distintos grupos experimentales (**Fig. 18E**). La relación pAKT/AKT aumentó a las 48 y 72 h en el grupo OHSS comparado a ovarios del grupo control ( $p<0,05$ ). La administración de TRAP al grupo OHSS disminuyó de manera significativa la relación pAKT/AKT comparado al grupo OHSS sin tratar, y este efecto se observó en ambos tiempos experimentales ( $p<0,05$ ).

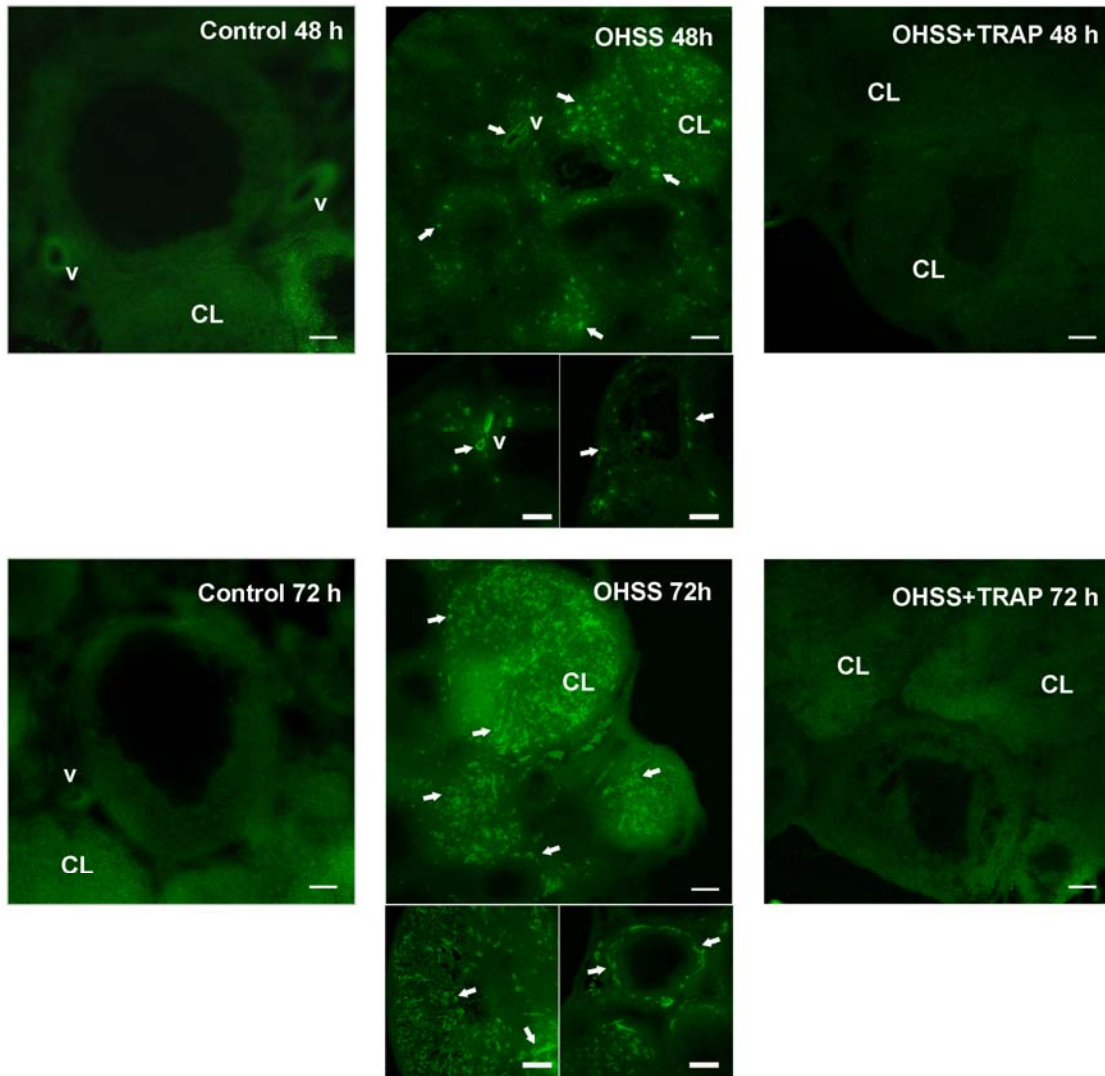


**Figura 18.** Efecto de la inhibición de VEGF sobre la expresión de sus receptores y la expresión de pAKT/AKT en ovarios de ratas del modelo OHSS **A)** Inmunoblots representativos para la expresión de pKDR, KDR y Flt-1. **B)** Cuantificación densitométrica de pKDR, **C)** KDR y **D)** Flt-1. **E)** Inmunoblots representativos de pAKT y AKT. **F)** Cuantificación densitométrica de la relación pAKT/AKT. La densidad óptica está expresada como unidades arbitrarias  $\pm$  SEM normalizadas a la  $\beta$ -actina ( $n=6$ /grupo, \*  $p<0.05$ ; \*\*  $p<0,01$ ).

### ***1.7 Evaluación de la permeabilidad vascular en ovario***

Dado que una de las características de este síndrome es el aumento de la permeabilidad vascular que lleva a la presencia de ascitis, evaluamos el efecto de la inhibición de VEGF sobre la extravasación de fluoresceína de sodio (NaFlu) en ovarios de los distintos grupos experimentales como parámetro de permeabilidad vascular.

En el grupo OHSS a las 48 y 72 h se observó una gran cantidad de áreas de extravasado de NaFlu en CL, en áreas estromales y en la red de capilares presente en la teca de folículos antrales comparado a los grupos control (***Fig. 19***). La inhibición de VEGF disminuyó las zonas de extravasado de NaFlu.

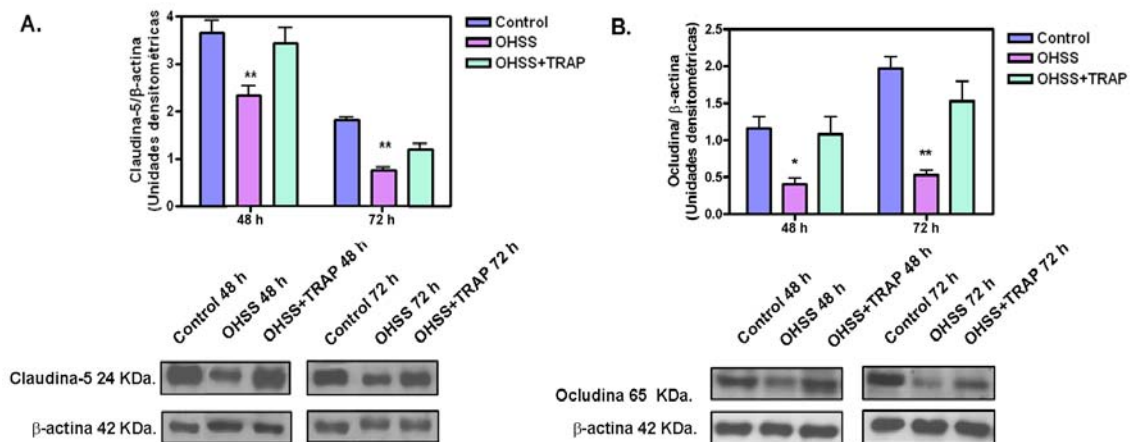


**Figura 19.** Efecto de la inhibición de VEGF sobre la permeabilidad vascular en ovarios de ratas del modelo OHSS. Se realizaron cortes de ovario por criostato luego de la inyección intraperitoneal de NaFlu (10%) en solución fisiológica a ratas pertenecientes a los distintos grupos experimentales ( $n=6$  ratas/grupo). Se visualizaron las áreas de extravasado en los ovarios (flechas). CL: cuerpo lúteo; v: vaso sanguíneo. Magnificación 100 X, recuadros 200 X, barras de escala indican 100  $\mu$ m.



**1.8. Efecto de la inhibición de VEGF sobre la expresión de proteínas de uniones estrechas: claudina-5 y ocludina**

Dado que la señalización a través de VEGF induce redistribución de las proteínas de uniones intercelulares y lleva a una pérdida de la estructura de barrera endotelial, decidimos estudiar la expresión ovárica de dos proteínas de uniones estrechas, claudina-5 y ocludina en el modelo de OHSS desarrollado en rata (**Fig. 20**). En el grupo OHSS, los niveles de claudina-5 disminuyeron comparado al grupo control ( $p < 0,01$ ). El tratamiento con TRAP previno esta disminución de claudina-5 comparada al grupo OHSS sin tratar ( $p < 0,01$ ). De la misma manera, en ovarios del grupo OHSS disminuyeron los niveles de ocludina comparado a ratas control (48 h  $p < 0,05$ ; 72 h  $p < 0,01$ ), mientras que la inhibición de VEGF en el grupo OHSS aumentó los niveles de ocludina comparado al grupo OHSS (48h  $p < 0,05$ ; 72h  $p < 0,01$ ).



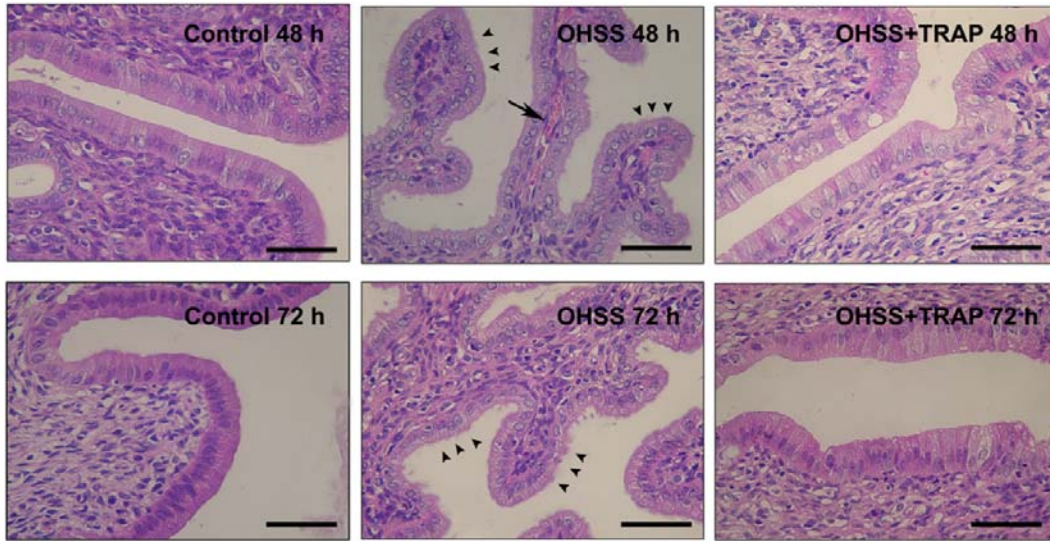
**Figure 20. Efecto de la inhibición de VEGF sobre la expresión de proteínas de uniones estrechas en ovarios provenientes del modelo OHSS desarrollado en rata. A) Cuantificación densitométrica de Claudina-5 y B) Ocludina. La densidad óptica está expresada como unidades arbitrarias (unidades  $\pm$  SEM) normalizadas a la  $\beta$ -actina ( $n=6$ /grupo). Paneles Inferiores: Inmunoblots representativos para claudina-5 y ocludina. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).**

### ***1.9 Efecto de la inhibición de VEGF sobre la histología y la proliferación endometrial.***

Durante los tratamientos de fertilización asistida las pacientes requieren de un endometrio receptivo para la implantación exitosa del embrión. Por este motivo, decidimos evaluar si el tratamiento con el inhibidor de VEGF afectaba la calidad del endometrio en ratas que desarrollaron OHSS.

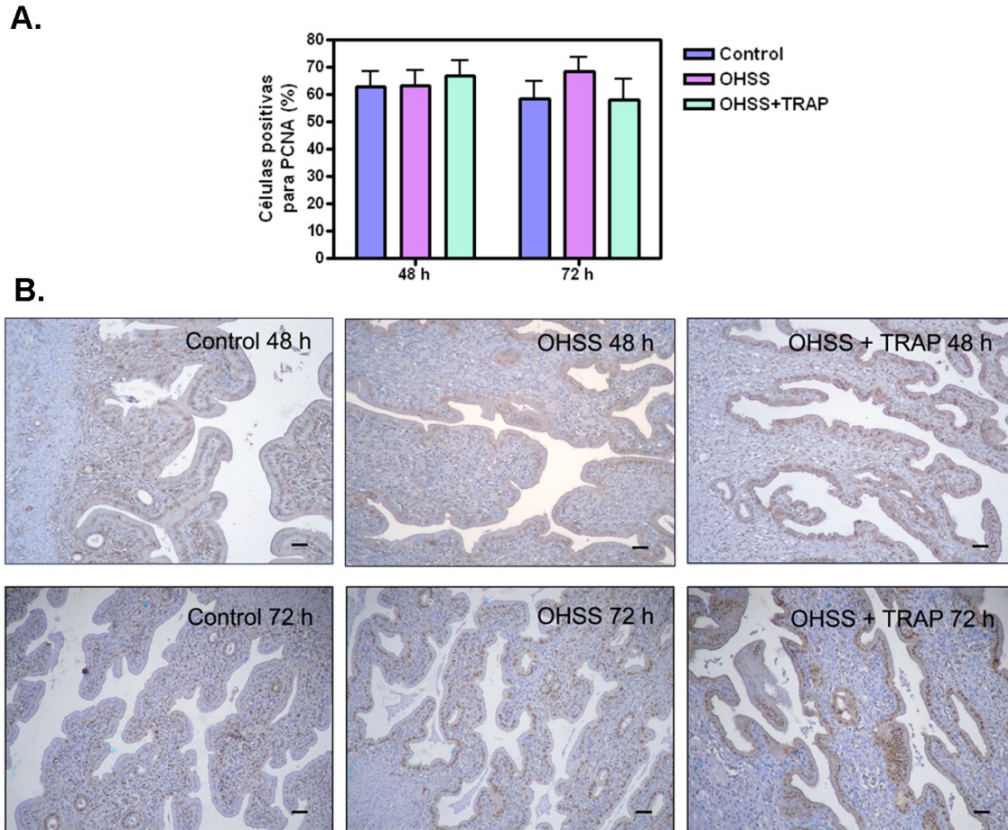
Las características histológicas de los endometrios fueron evaluadas en los diferentes grupos experimentales (**Fig. 21**). El endometrio del grupo control a las 48 y 72 h mostró un epitelio conservado con glándulas normales y células epiteliales no ciliadas embebidas en un estroma laxo y tejido conectivo conservado. Por el contrario, en el grupo OHSS en ambos tiempos analizados, el endometrio se encontró más engrosado, con varios plegamientos, pequeñas cilias en las células epiteliales, capa de miometrio y tejido conectivo engrosado. Además, se observó mayor vasculatura en los endometrios respecto a los grupos control. En los endometrios de los grupos OHSS tratados con TRAP a las 48 h se observó atrofia de la mucosa endometrial, vacuolización citoplasmática que corresponde a daño celular reversible provocado por hipoxia celular, menor cantidad de pliegues epiteliales y de estroma, y abundantes cilias epiteliales. Luego de las 72 h del tratamiento con TRAP, los endometrios mostraron epitelio y estroma endometrial más conservados comparado al grupo OHSS 72 h y estructuralmente similar al control. Además, el tejido conectivo se encontró más afinado y los pliegues epiteliales más regulares. Cabe notar, que los endometrios del grupo OHSS+TRAP 72 h recuperaban su arquitectura normal comparado al grupo OHSS+TRAP 48 h.





**Figura 21.** Efecto de la inhibición de VEGF sobre la histología endometrial en secciones de útero de ratas en un modelo de OHSS desarrollado. Las imágenes muestran campos representativos de endometrios teñidos con H&E. Las cabezas de flechas indican células ciliadas; las flechas indican vasos sanguíneos. Magnificación 400X. Escala 50  $\mu$ m.

Para evaluar el efecto de la inhibición de VEGF sobre la proliferación endometrial, realizamos una inmunohistoquímica para PCNA en secciones de úteros de las ratas de los distintos grupos experimentales. El porcentaje de células PCNA positivas se calculó en el epitelio luminal y glandular. No se observaron diferencias significativas en la proliferación celular entre los grupos analizados (**Fig. 22**).

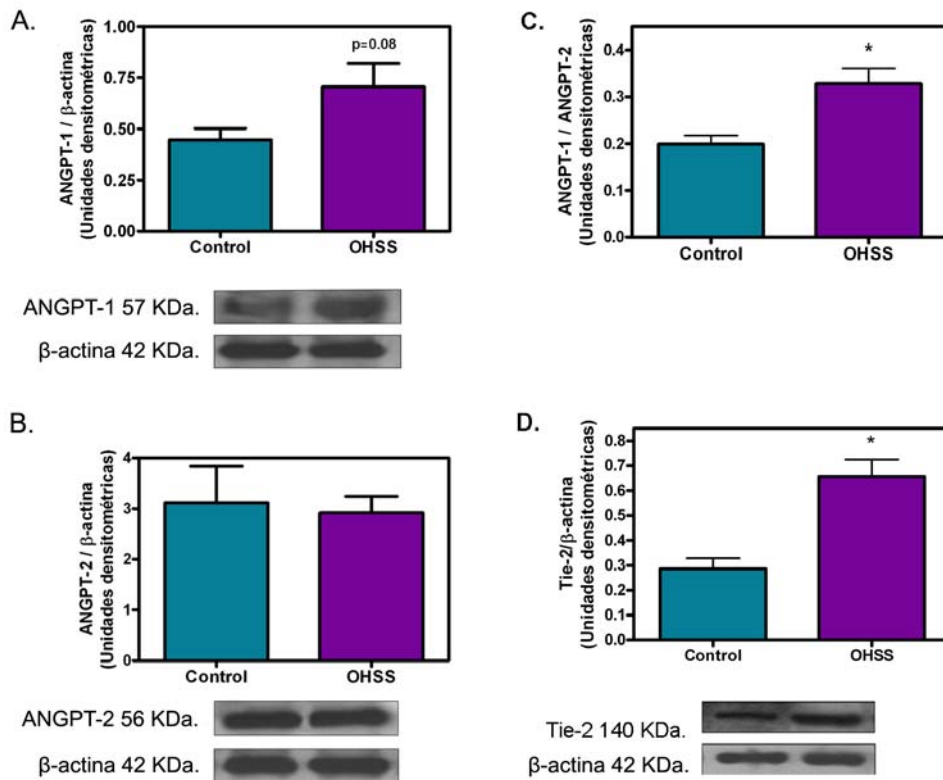


**Figure 22. Efecto de la inhibición de VEGF sobre la proliferación de células epiteliales en endometrios provenientes del modelo OHSS desarrollado en rata. (A) Se contaron 300 células glandulares y luminales en endometrios y se calculó el porcentaje de células PCNA positivas/área. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  SEM ( $n=6$ /grupo). (B) Las imágenes muestran secciones de úteros inmunomarcadas para PCNA en los seis grupos experimentales. Magnificación 100X. La escala corresponde a 50  $\mu$ m.**

## CAPÍTULO II: Efecto de la inhibición de ANGPT-1 en OHSS

### 1. Niveles de los miembros del sistema de ANGPTs/Tie en un modelo de OHSS desarrollado en roedor.

Estudiamos el contenido proteico de los miembros del sistema de ANGPTs/Tie-2 en el modelo OHSS en rata. Los resultados muestran una tendencia al aumento en los niveles de ANGPT-1 en ovarios de ratas OHSS respecto al grupo control ( $p=0,08$ ). Además los niveles de ANGPT-2 se mantuvieron constantes. Sin embargo, la relación ANGPT-1/ANGPT-2 se encuentra significativamente aumentada en los ovarios OHSS respecto a los controles. Más aún, los niveles del receptor de membrana Tie-2 (mTie-2) fueron significativamente mayores en el grupo OHSS respecto al grupo control ( $p<0,05$ ) (Fig. 23).



**Figura 23. Análisis de los miembros de ANGPTs/Tie-2 en ovarios provenientes de ratas del modelo OHSS.** Cuantificación densitométrica de (A) ANGPT-1, (B) ANGPT-2, (C) Relación ANGPT1/ANGPT2y D) Tie-2. La densidad óptica está expresada como unidades arbitrarias unidades  $\pm$  SEM) normalizadas a la  $\beta$ -actina (n=6 ratas/grupo). Inmunoblots representativos para ANGPT-1, ANGPT-2 y Tie-2 se muestran en los paneles inferiores.

## **2. Análisis de la expresión de los miembros del sistema de ANGPTs/Tie en FF y en CGLs de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS**

En base a los resultados obtenidos en el modelo OHSS en rata, nuestro próximo objetivo fue evaluar los niveles de ANGPT-1, ANGPT-2 y sTie-2 en fluido folicular (FF) y en cultivos de células de la granulosa luteínicas (CGLs) provenientes de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS.

### ***2.1. Características de las pacientes.***

El criterio de selección de una paciente con riesgo a desarrollar OHSS fue un número mayor a 20 ovocitos recuperados por ciclo de estimulación ovárica y niveles de E<sub>2</sub> séricos el día de la administración de hCG mayores a 3000 pg/ml.

El número de ovocitos recuperados y los niveles de estradiol en el día de la administración de hCG, pero no la tasa de embarazo, fueron significativamente diferentes entre las pacientes OHSS y las pacientes control utilizadas en este estudio (*Tabla 4*).

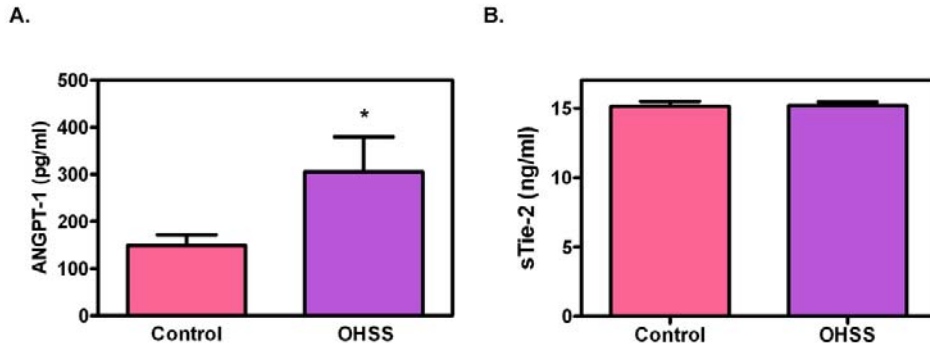
**Tabla 4. Características de las pacientes control y OHSS**

	<b>Control (n=20)</b>	<b>OHSS (n=19)</b>	<b>Valor P</b>
<b><i>Edad (años)</i></b>	34,22 ± 0,78	32,62 ± 0,67	NS
<b><i>Ovocitos recuperados (número)</i></b>	10,75 ± 0,84	28,63 ± 1,99	< 0,0001
<b><i>Estradiol sérico (pg/ml)</i></b>	1919 ± 203	3453 ± 133	< 0,0001
<b><i>Tasa de embarazo (%)</i></b>	52	57	NS

*Nota: Los valores están expresados como la media ± ES. NS= no significativo.*

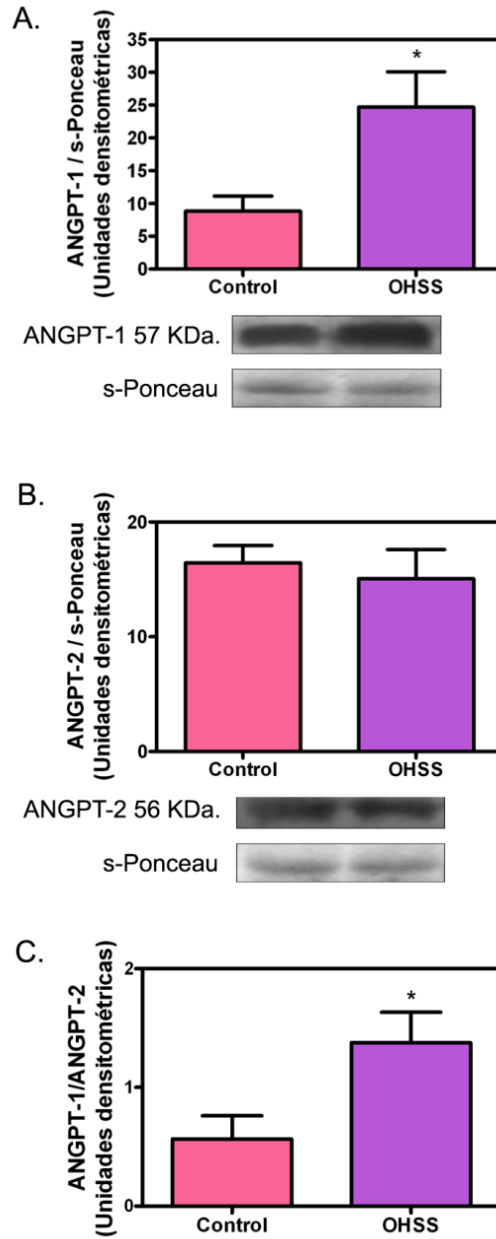
### ***2.2 Niveles de ANGPT-1 y el receptor soluble Tie-2 en FF de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS.***

Los niveles de ANGPT-1 y su receptor soluble Tie-2 (sTie-2) fueron medidos por ELISA. La concentración de ANGPT-1 en FF fue significativamente mayor en pacientes con riesgo a desarrollar OHSS respecto a pacientes control ( $p < 0,05$ ) (**Fig. 24A**). Sin embargo, no existen diferencias significativas entre ambos grupos en los niveles del receptor sTie-2. (**Fig. 24B**).



**Figura 24. Niveles de ANGPT-1 (A) y Tie-2 soluble (B) en FF de pacientes con riesgo a OHSS y pacientes controles medidos por ELISA. Los datos están expresados como  $\pm$  SEM. (OHSS:  $n=19$ , control:  $n=20$ ; \*  $p < 0.05$ ).**

La liberación de ANGPTs al FF también fue medida por Western blot. Los resultados para ANGPT-1 confirmaron aquellos obtenidos por ELISA ( $p < 0,05$ ), y los niveles de ANGPT-2 fueron similares entre ambos grupos (**Fig. 25A-B**). Sin embargo, existe un marcado aumento en la relación ANGPT-1/ANGPT-2 en FF de pacientes OHSS comparado a aquellas pacientes que no desarrollaron el síndrome (**Fig. 25C**).



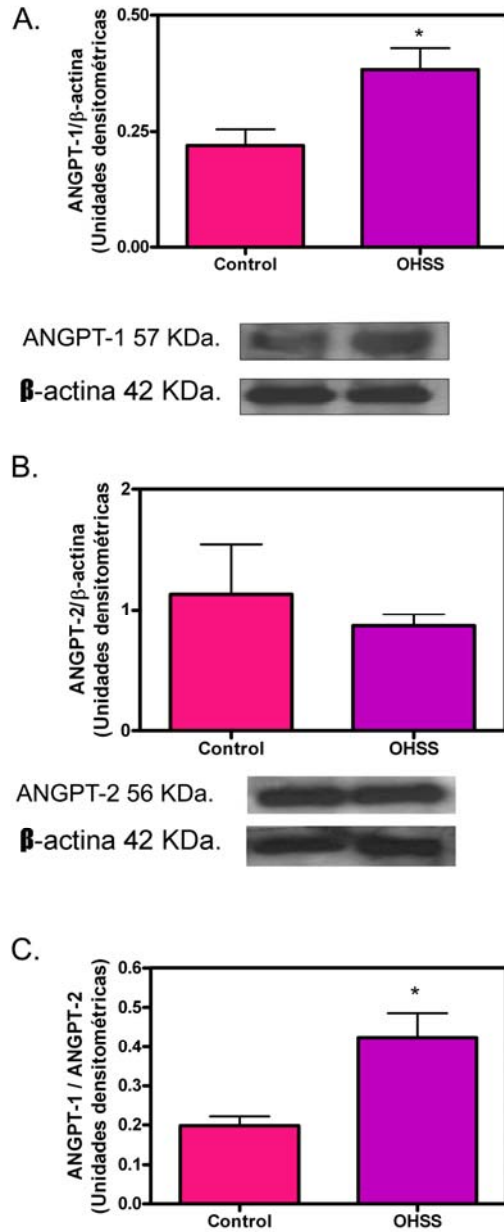
**Figura 25. Niveles de ANGPTs en FF de pacientes control y con riesgo de OHSS medidos por Western blot. A) Cuantificación densitométrica de ANGPT-1 y B) ANGPT-2. C) Relación ANGPT-1/ANGPT-2. Los datos están expresados como unidades arbitrarias  $\pm$  SEM normalizadas a la banda constante obtenida en la membrana teñida con S-Ponceau. Inmunoblots representativos de ANGPT-1 y ANGPT-2 se muestran en el panel inferior. (OHSS: n=19, control: n=20; \*  $p < 0.05$ ).**

### ***2.3 Niveles de ANGPT-1 y -2 en CGLs de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS.***

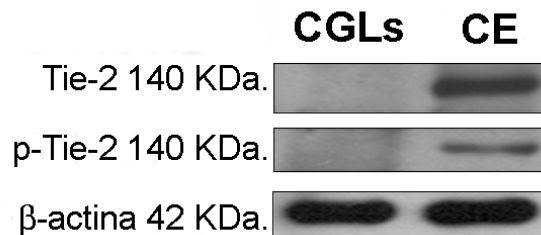
Para evaluar si el aumento en los niveles de ANGPT-1 en FF de pacientes con riesgo a OHSS proviene principalmente de las células de granulosa, realizamos un cultivo de CGL y las estimulamos con hCG (1 IU/ml). Mediante Western blot, observamos que las CGL provenientes de pacientes OHSS expresaron altos niveles de ANGPT-1 comparado a células provenientes de pacientes controles (***Fig. 26A***). No observamos cambios significativos en los niveles de ANGPT-2 entre ambos grupos de pacientes (***Fig. 26B***). Sin embargo, se observó un marcado incremento en la relación ANGPT-1/ANGPT-2 en CGL de pacientes con riesgo a OHSS comparado a pacientes controles (***Fig. 26C***).

Para evaluar un posible efecto autócrino de la ANGPT-1 sobre las células de granulosa, realizamos un western blot a partir de homogenatos proteicos provenientes de estas células para detectar la presencia del receptor mTie-2. Los resultados mostraron que las CGL carecen del receptor mencionado. (***Fig. 27***).





**Figura 26.** Expresión de ANGPTs en células de la granulosa-luteínicas de pacientes control y con riesgo de OHSS en respuesta a hCG medido por Western blot. **A)** Cuantificación densitométrica de ANGPT-1 y **B)** ANGPT-2. **C)** Relación ANGPT-1/ANGPT-2. Los datos están expresados como unidades arbitrarias  $\pm$  SEM normalizadas a  $\beta$ -actina. Inmunoblots representativos de ANGPT-1 y ANGPT-2 se muestran en el panel inferior. (OHSS:  $n=12$ , control:  $n=15$ ;  $*p < 0.05$ ).



**Figura 27. Expresión y fosforilación del receptor Tie-2 en células de la granulosa luteínica (CGLs). Se utilizaron homogenatos proteicos de una línea endotelial humana (CE) como control positivo. Las CGLs no expresan el receptor Tie-2.**

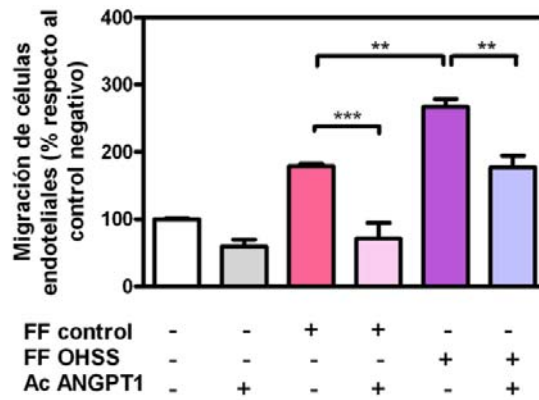
### **3. Efecto de los FF provenientes de pacientes sometidas a ART con riesgo a desarrollar OHSS incubados con un inhibidor de ANGPT-1 en una línea humana de células endoteliales**

#### ***3.1. Efecto de los FF incubados con un anticuerpo neutralizante anti ANGPT-1 sobre la migración de células endoteliales***

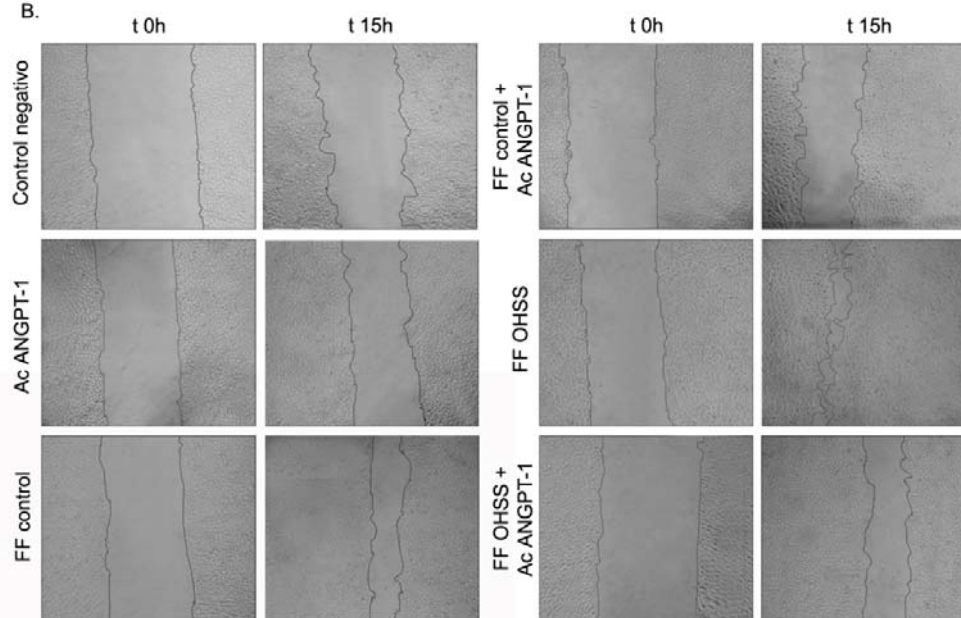
Con el fin de analizar el efecto de la ANGPT-1 sobre la angiogénesis ovárica en pacientes OHSS, evaluamos el efecto de los FF sobre la migración de células endoteliales en presencia de un anticuerpo neutralizante anti ANGPT-1. Para este fin, realizamos el ensayo de migración por herida en un cultivo de células endoteliales.

Cuando se incubaron las células endoteliales en presencia de los FF de pacientes OHSS aumentó de manera significativa la migración celular comparado a FF de pacientes control ( $p < 0,01$ ) (**Fig 28**). La incubación de FF de pacientes OHSS en presencia de un anticuerpo neutralizante anti ANGPT-1 disminuyó de manera significativa la migración celular inducida por el FF de pacientes OHSS sin el inhibidor ( $p < 0,05$ ).

A.



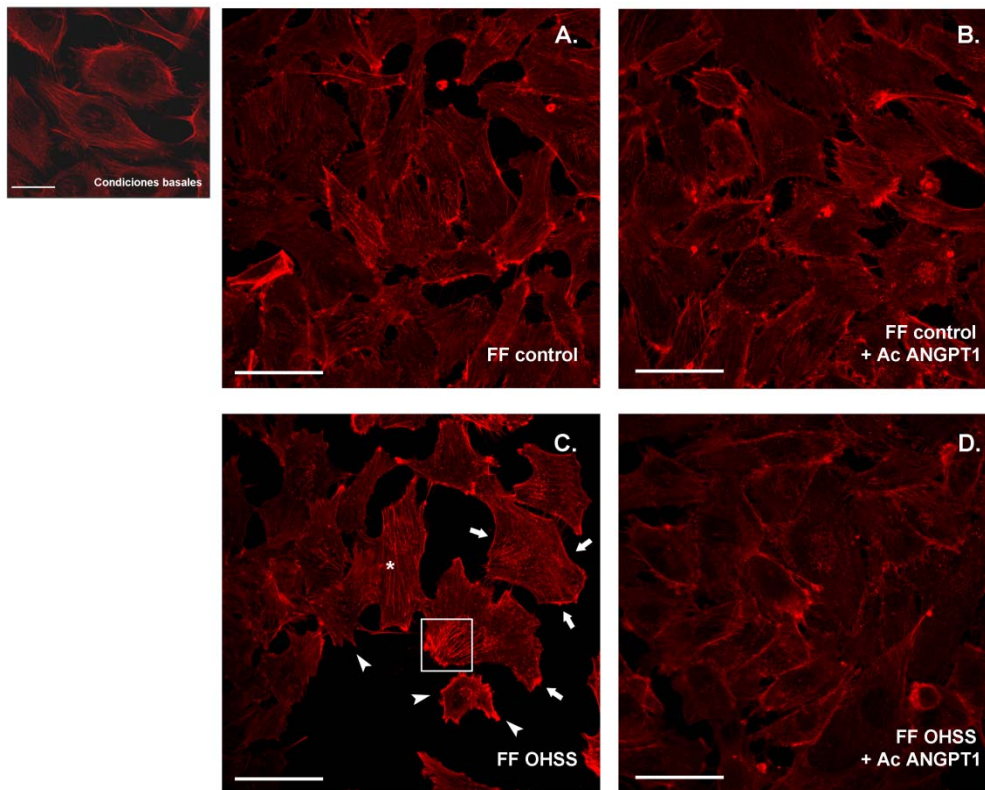
B.



**Figura 28. Efecto de FF sobre la migración de células endoteliales medido por ensayo de la herida.** A) Cuantificación del porcentaje de migración celular. Las barras representan el % de migración de células endoteliales respecto al control negativo. La migración del control negativo (células endoteliales cultivadas sin suero) fue tomada arbitrariamente como 100%. Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes (OHSS:  $n=19$ , control:  $n=20$ ; \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$ ). B) Imágenes representativas de la inducción de la migración endotelial en el ensayo de migración por herida por FF preincubados con o sin un anticuerpo neutralizante anti ANGPT-1. Magnificación 40X.

### ***3.2. Efecto de los FF incubados con un anticuerpo neutralizante anti ANGPT-1 sobre la integridad del citoesqueleto de actina de células endoteliales***

Mediante microscopía de fluorescencia evaluamos la organización de los filamentos de actina de las células endoteliales utilizando faloidina conjugada a TRITC (**Fig. 15**). Los resultados mostraron que la incubación de las células endoteliales con FF de pacientes OHSS causó cambios en la forma de las células debido a un rearrreglo de los filamentos de actina. Esta observación se evidencia por la presencia de fibras de estrés entrecruzadas a lo largo de todo el citoplasma de las células comparado a células endoteliales incubadas con FF de pacientes control. Además, la formación de espacios paracelulares fue inducida en células endoteliales incubadas con FF de pacientes OHSS comparada a aquellas incubadas con FF de pacientes control (**Fig. 29 A y C**). La preincubación de FF de pacientes OHSS con el anticuerpo neutralizante anti ANGPT-1 revirtió parcialmente la redistribución de los filamentos de actina observada en el grupo OHSS y disminuyó los espacios paracelulares (**Fig. 29 D**).

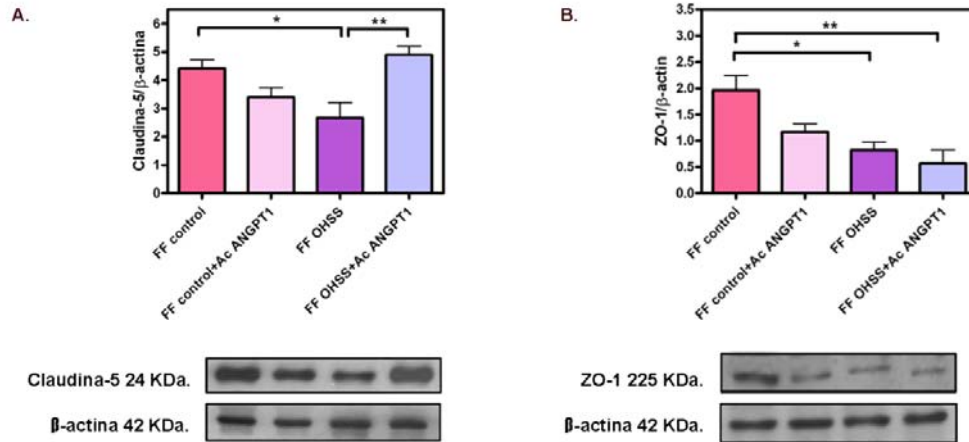


**Figura 29. Cambios morfológicos en la organización del citoesqueleto de actina en células endoteliales en presencia de FF de pacientes con riesgo a OHSS con un anticuerpo neutralizante anti ANGPT-1.** *Imágenes representativas de filamentos de actina teñidos con faloidina-TRITC en células endoteliales incubadas con A) FF de pacientes control, B) FF de pacientes control preincubados con un anticuerpo anti ANGPT-1, C) FF de pacientes OHSS y D) FF de pacientes OHSS preincubados con un anticuerpo anti ANGPT-1. Las cabezas de flecha indican espacios paracelulares, las flechas indican bandas corticales, el recuadro indica “capuchón de actina perinuclear” y los asteriscos indican fibras de estrés. Las células endoteliales cultivadas en medio de cultivo sin suero representan las condiciones basales. Magnificación 60X. Escala 50  $\mu$ m.*

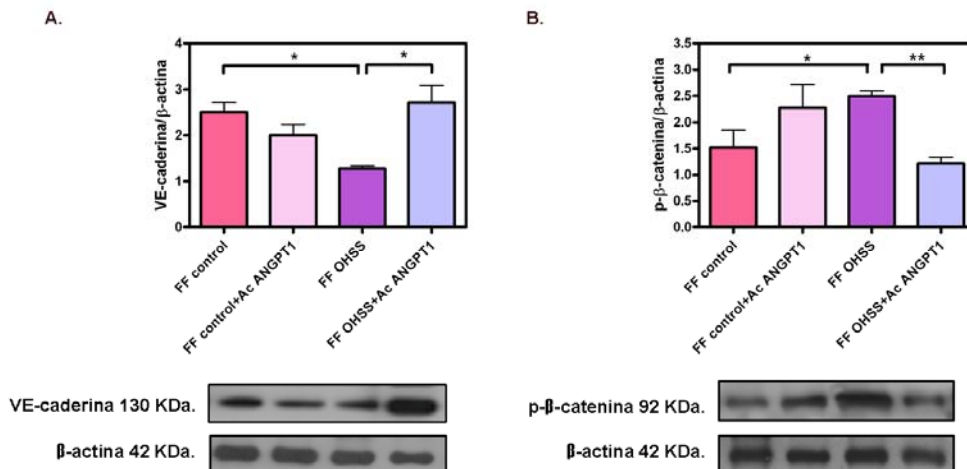
### ***3.3. Efecto de los FF incubados con un anticuerpo neutralizante anti ANGPT-1 sobre la expresión de proteínas de uniones intercelulares en células endoteliales en presencia de FF de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS.***

Evaluamos la expresión de las proteínas de las uniones estrechas, Claudina-5 y ZO-1, en células endoteliales incubadas con FF de pacientes OHSS, con o sin el agregado del anticuerpo neutralizante anti ANGPT-1. Los niveles de claudina-5 en células endoteliales incubadas con FF OHSS fueron menores comparados a los del grupo control ( $p < 0,05$ ), pero mayores en presencia del anticuerpo anti ANGPT-1 ( $p < 0,01$ ) (**Fig. 30 A**). Los niveles de ZO-1 en células endoteliales incubadas con FF OHSS fueron menores comparados al grupo control ( $p < 0,05$ ) (**Fig. 30 B**). No se observaron diferencias significativas con la neutralización de la ANGPT-1 en FF de pacientes OHSS (**Fig. 30 B**).

Otra de las uniones intercelulares que estudiamos fueron las uniones adherentes. Para tal fin, evaluamos la expresión de VE-caderina y  $\beta$ -catenina fosforilada (forma activa) en células endoteliales incubadas con FF de pacientes OHSS con o sin la preincubación con el anticuerpo anti ANGPT-1. Los niveles de VE-caderina en células endoteliales incubadas con FF OHSS disminuyó comparado al grupo control ( $p < 0,05$ ), y fue restablecido en presencia del anticuerpo anti ANGPT-1 ( $p < 0,001$ ) (**Fig. 31A**). Los niveles de la forma fosforilada de la  $\beta$ -catenina en células endoteliales incubadas con FF de pacientes OHSS aumentó comparado a pacientes control ( $p < 0,05$ ). La neutralización de ANGPT-1 en FF OHSS previno la fosforilación de  $\beta$ -catenina inducida por los FF OHSS sin tratar ( $p < 0,05$ ) (**Fig. 31B**).



**Figura 30.** Efecto del FF de pacientes con riesgo a OHSS en presencia de un anticuerpo neutralizante anti ANGPT-1 sobre la expresión de proteínas de uniones estrechas. **A)** Cuantificación densitométrica de Claudina-5. **B)** Cuantificación densitométrica de ZO-1. Inmunoblots representativos se muestran en los paneles inferiores. Los datos están expresados como la media  $\pm$  SEM normalizado a  $\beta$ -actina de 3 experimentos independientes (Control, n= 20 pacientes; OHSS, n= 19 pacientes). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .



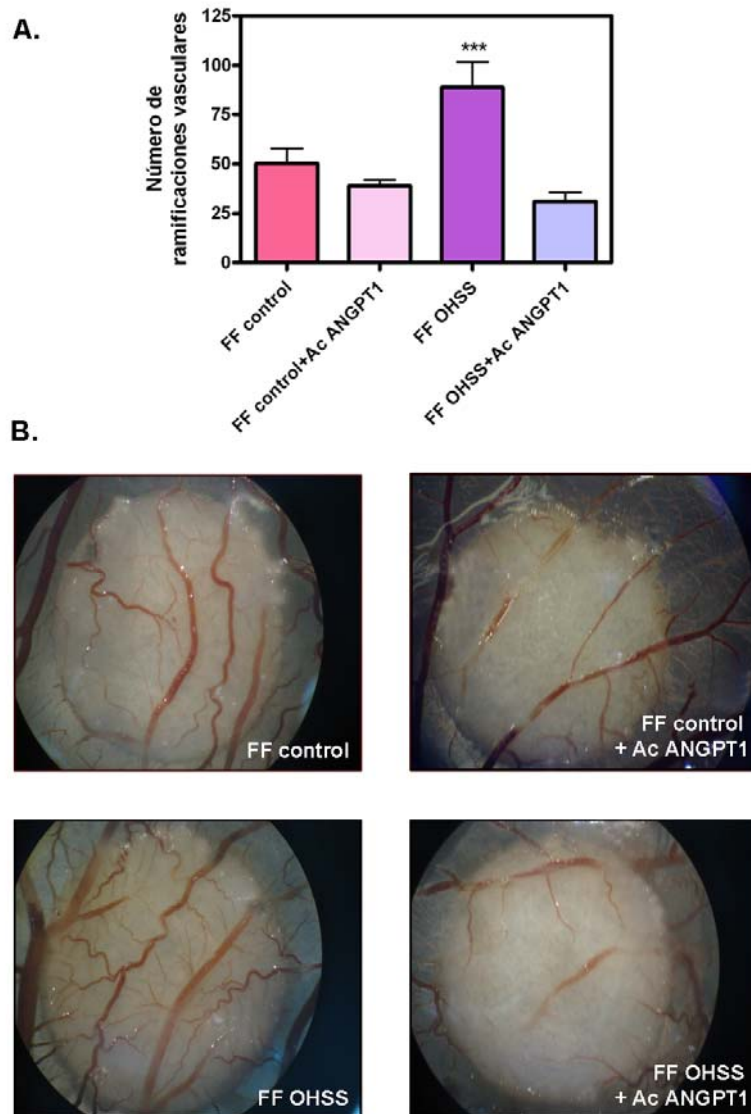
**Figura 31.** Efecto del FF de pacientes con riesgo a OHSS en presencia de un anticuerpo neutralizante anti ANGPT-1 sobre la expresión de proteínas de uniones adherentes. **A)** Cuantificación densitométrica de VE-cadherina. **B)** Cuantificación densitométrica de fosfo- $\beta$ -catenina. Inmunoblots representativos se muestran en los paneles inferiores. Los datos están

*expresados como la media  $\pm$  SEM normalizado a  $\beta$ -actina de 3 experimentos independientes (Control, n= 20 pacientes; OHSS, n= 19 pacientes) (\*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ).*

#### ***4. Efecto de FF incubados con un inhibidor de ANGPT-1 en un modelo de angiogénesis in-vivo (CAM, membrana corioalantoidea de embrión de codorniz japónica)***

Mediante el ensayo de angiogénesis CAM estudiamos el efecto que producen los FF de pacientes OHSS en presencia de un inhibidor de ANGPT-1 sobre la vasculatura. Los FF de pacientes OHSS aumentaron significativamente el número de ramificaciones vasculares en las CAM comparado al grupo control ( $p < 0,001$ ). La presencia del anticuerpo neutralizante anti ANGPT-1 en FF de pacientes OHSS revirtió el número de ramificaciones vasculares a valores control ( $p < 0,001$ ) (**Fig. 32**).

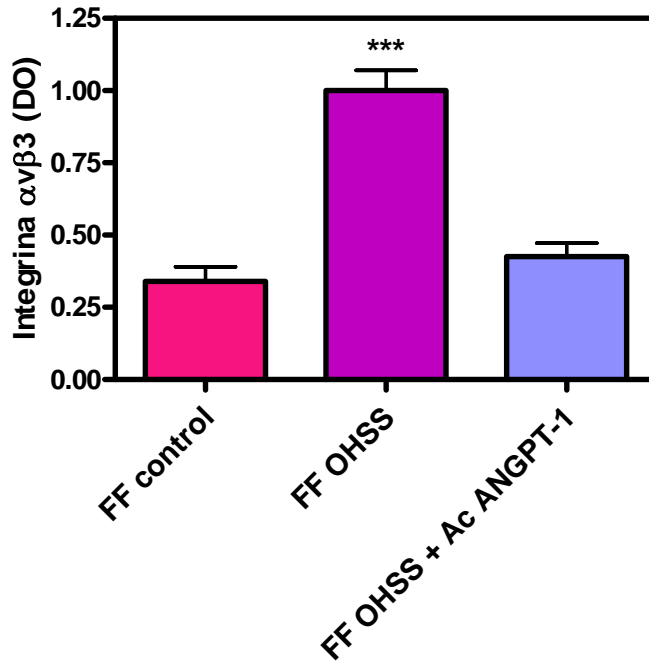




**Figura 32. Efecto del FF de pacientes con riesgo a OHSS en presencia de un anticuerpo neutralizante anti ANGPT-1 sobre la angiogénesis. A) Cuantificación del número de ramificaciones vasculares en membrana corionalantoide de codorniz (CAMs). Los datos están expresados como la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes (Control,  $n= 20$  pacientes; OHSS,  $n= 19$  pacientes). \*\*\* $p<0.001$ . B) Imágenes representativas de los distintos grupos experimentales.**

Por otro lado, estudiamos los niveles de la integrina  $\alpha\beta 3$  por ELISA, en extractos proteicos de CAMs incubadas en las distintas condiciones. Los resultados

mostraron un aumento significativo de los niveles de la integrina  $\alpha\beta3$  en CAMs incubadas con FF de pacientes OHSS comparadas a las incubadas con FF de pacientes control ( $p<0,001$ ). El bloqueo de la ANGPT-1 en FF de pacientes OHSS disminuyó los niveles de la integrina  $\alpha\beta3$  integrina en CAMs ( $p<0,001$ ) (**Fig. 33**).



**Figura 33.** Efecto del FF de pacientes con riesgo a OHSS en presencia de un anticuerpo neutralizante anti ANGPT-1 sobre los niveles de la integrina  $\alpha\beta3$  en CAMs medidos por ELISA. Los datos están expresados como la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes (Control,  $n=20$  pacientes; OHSS,  $n= 19$ ; \*\*\* $p<0,001$ ).

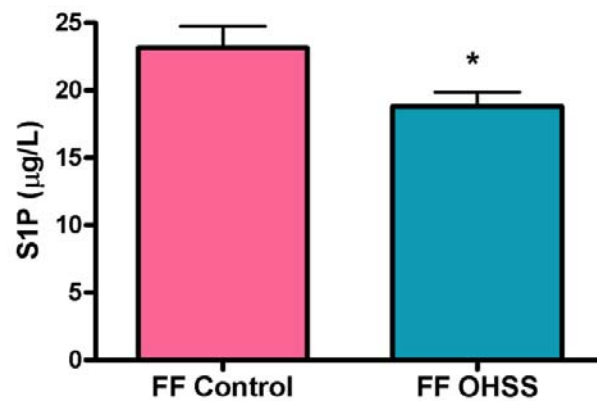
### CAPÍTULO III: Participación del esfingolípido S1P en el desarrollo de OHSS

#### 1. Niveles de S1P en FF de pacientes OHSS

La esfingosina 1-fosfato (S1P) es un esfingolípido que regula un amplio rango de procesos biológicos tales como proliferación, migración y mantenimiento de la integridad de la barrera endotelial. Actúa principalmente mediante la unión y activación específica de receptores de superficie celular acoplados a proteína G, denominados receptores de S1P (S1P1-5). Dado que en condiciones patológicas es un agente protector y estabilizante del desarrollo vascular frente a señales angiogénicas aberrantes, decidimos determinar los niveles de S1P en FF de pacientes OHSS.

Cabe notar, que von Otte y col. (2006) fueron no solo los primeros en demostrar la presencia de este esfingolípido en el FF de pacientes normales sino también su capacidad de estimular la formación de nuevos vasos sanguíneos [152].

La concentración de S1P en FF de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS fue significativamente menor respecto a FF de pacientes control ( $p < 0,05$ ) (**Fig. 34**).



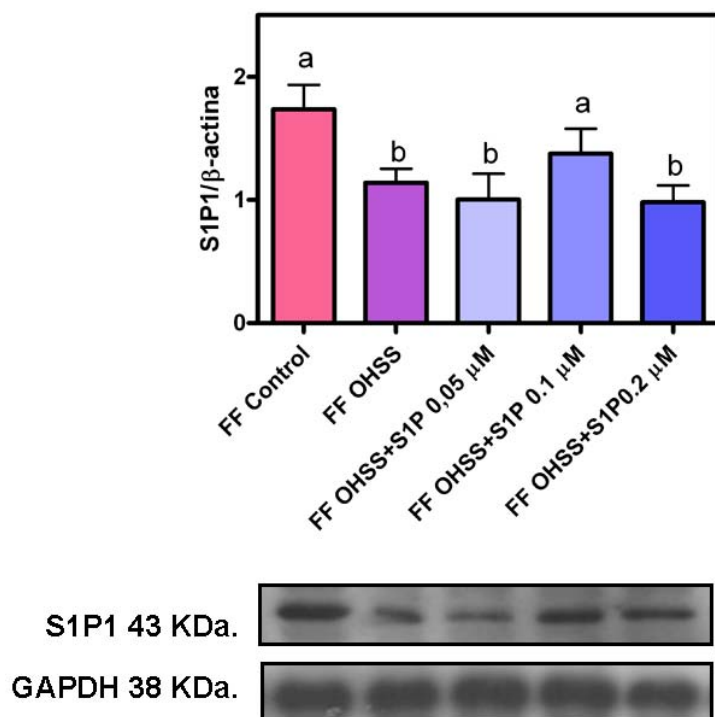
**Figura 34.** Niveles de S1P en FF de pacientes OHSS medidos por ELISA. Los datos están expresados como la media  $\pm$  SEM. (OHSS:  $n=20$ , control:  $n=20$ ; \*  $p < 0,05$ ).

**2. Efecto de los FF provenientes de pacientes sometidas a ART con riesgo a desarrollar OHSS incubados en presencia de S1P en una línea humana de células endoteliales**

***2.1. Niveles del receptor S1P1 en células endoteliales incubadas con FF de pacientes control y con riesgo a OHSS en presencia de S1P.***

La señalización a través del receptor 1 de S1P, S1P1, en células endoteliales es necesaria para mediar diversas respuestas celulares que incluyen proliferación, migración, organización del citoesqueleto, formación de uniones adherentes, entre otras [137;244;244;245]. Por lo tanto, decidimos estudiar la expresión de este receptor en células endoteliales incubadas con FF de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS en presencia de S1P.

La expresión del receptor S1P1 en células endoteliales incubadas con FF de pacientes con riesgo a OHSS fue significativamente menor respecto a FF control ( $p < 0,05$ ). El agregado de S1P ( $0,1 \mu\text{M}$ ) a FF de pacientes OHSS revirtió estos valores a niveles de pacientes control ( $p < 0,05$ ) (**Fig. 35**).



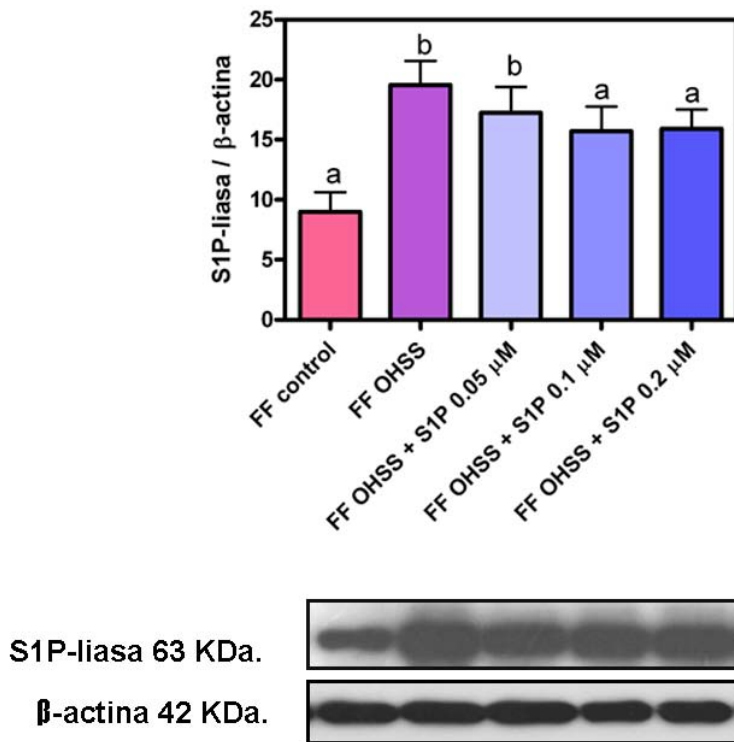
**Figura 35.** Efecto del FF de pacientes con riesgo a OHSS en presencia de S1P sobre la expresión del receptor S1P1. Cuantificación densitométrica del receptor S1P1. Inmunoblots representativos se muestran en los paneles inferiores. Los datos están expresados como la media  $\pm$  SEM normalizado a  $\beta$ -actina de 3 experimentos independientes (Control,  $n=20$  pacientes; OHSS,  $n=19$  pacientes). Análisis de Varianza (ANOVA), seguido por el test de Dunnett's,  $a$  vs  $b$   $p<0,05$ ; comparando todas las columnas versus el grupo "FF control".

## 2.2. Niveles de la enzima S1P-liasa (SPL) en células endoteliales incubadas con FF de pacientes control y con riesgo a OHSS en presencia de S1P.

Los niveles celulares de S1P están regulados por su síntesis y catabolismo. La esfingosina 1-fosfato liasa (SPL) es una enzima fundamental del metabolismo de los

esfingolípidos y cataliza la degradación irreversible del S1P a fosfoetanolamina y hexadecanal, regulando de esta manera, su concentración intracelular [246].

La expresión de la SPL en células endoteliales incubadas con FF OHSS fue significativamente mayor respecto a células endoteliales incubadas con FF control ( $p < 0,01$ ). El agregado de S1P en concentraciones de 0,1 y 0,2  $\mu\text{M}$  a FF OHSS disminuyó su expresión a valores comparables a los inducidos por FF de pacientes control ( $p < 0,05$ ) (**Fig. 36**).



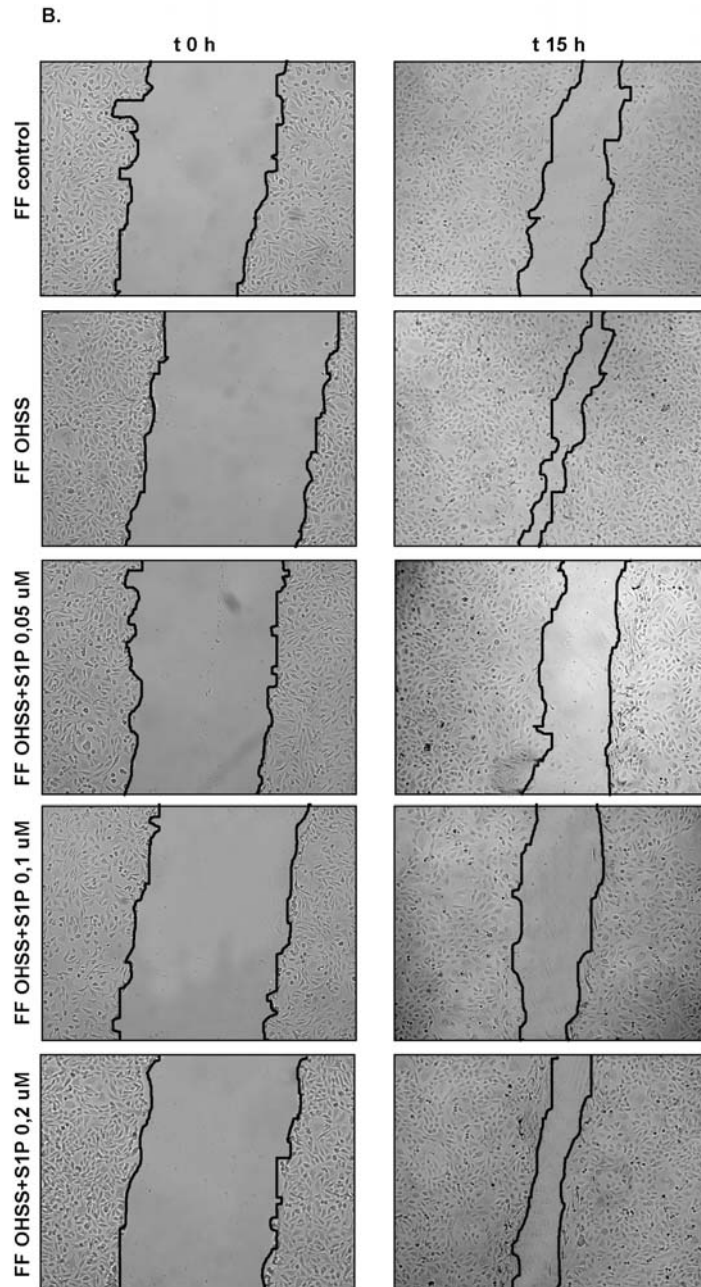
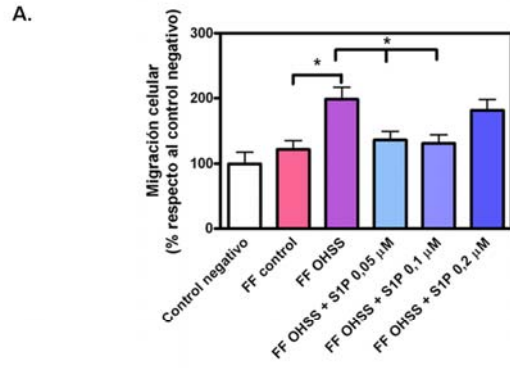
**Figura 36.** Efecto del FF de pacientes con riesgo a OHSS en presencia de S1P sobre la expresión de la enzima SPL. Cuantificación densitométrica de SPL. Inmunoblots representativos se muestran en los paneles inferiores. Los datos están expresados como la media  $\pm$  SEM normalizado a  $\beta$ -actina de 3 experimentos independientes (Control,  $n = 20$  pacientes; OHSS,  $n = 19$  pacientes). Análisis de

*Varianza (ANOVA), seguido por el test de Dunnett's, a vs b  $p < 0,05$ , comparando todas las columnas versus el grupo "FF control".*

***2.3. Efecto de los FF de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS incubados en presencia de S1P sobre la migración de células endoteliales.***

La migración de células endoteliales en presencia de FF de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS aumentó de manera significativa comparada a la migración inducida por FF de pacientes control ( $p < 0,05$ ), tal como lo demostrado en el **Capítulo II**.

El agregado de S1P (0,05 y 0,1  $\mu\text{M}$ ) a FF de pacientes OHSS disminuyó la migración celular comparado a FF OHSS sin el esfingolípido ( $p < 0,05$ ) (**Fig. 37**).



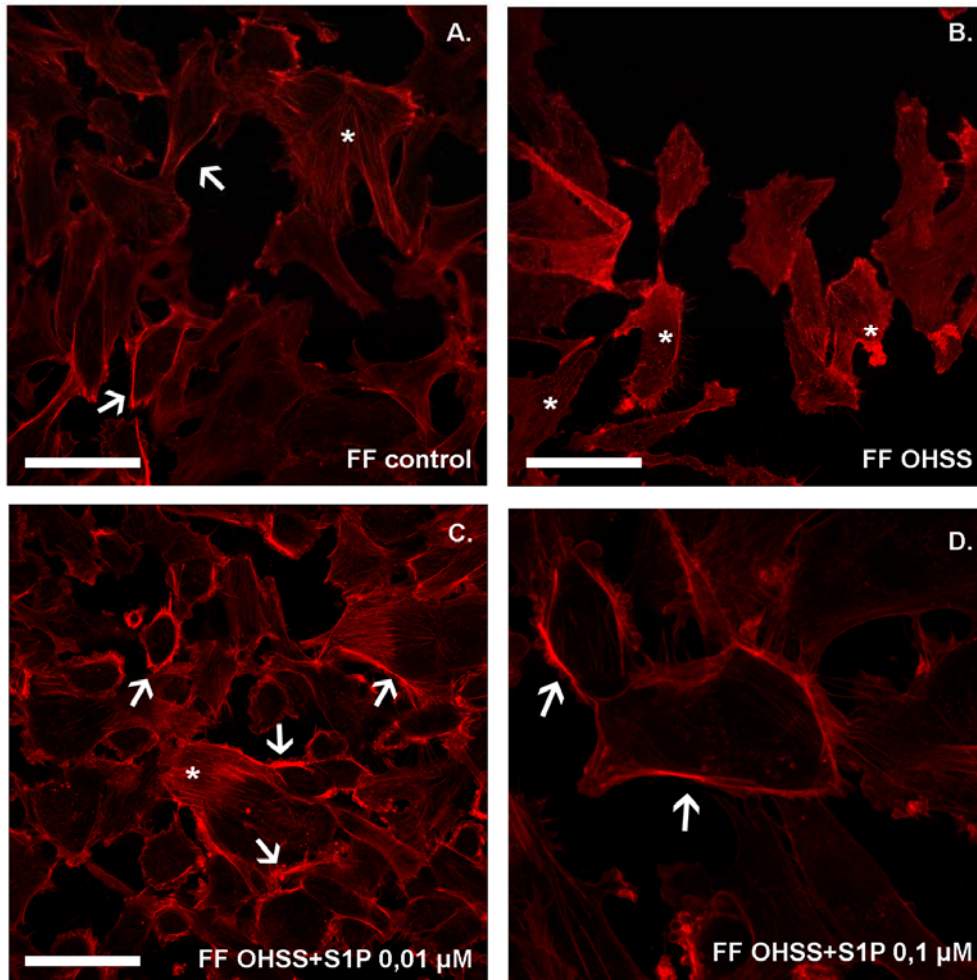


**Figura 37. Efecto de FF sobre la migración de células endoteliales medido por ensayo de la herida. A)** Cuantificación del porcentaje de migración celular. Las barras representan el % de migración de células endoteliales respecto al control negativo. La migración del control negativo (células endoteliales cultivadas sin suero) fue tomada arbitrariamente 100%. Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  SEM (OHSS: n=19, control: n=20; \*  $p < 0,05$ ), de tres experimentos independientes. **B)** Imágenes representativas de la inducción de la migración endotelial en el ensayo de migración por herida por FF en presencia de SIP. Magnificación 100X.

#### **2.4. Efecto de los FF de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS incubados en presencia de SIP sobre la integridad del citoesqueleto de actina en células endoteliales.**

La activación del receptor SIP1 en células endoteliales lleva a cambios en el citoesqueleto de actina modulando la integridad de la barrera endotelial [247;248].

Mediante microscopía de fluorescencia evaluamos la organización de los filamentos de actina de las células endoteliales utilizando faloidina conjugada a TRITC (**Fig. 38**). De la misma manera que en el **Capítulo II**, los resultados mostraron que en presencia de FF de pacientes OHSS, las células cambiaron su forma debido a la formación de fibras de estrés entrecruzadas a lo largo de todo el citoplasma de las células y presencia de espacios paracelulares, comparado a células endoteliales incubadas con FF de pacientes control (**Fig. 38 A - B**). El agregado de SIP (0,1  $\mu$ M) a FF de pacientes OHSS no solo revirtió parcialmente la redistribución de los filamentos de actina observada en el grupo OHSS sino también disminuyó los espacios paracelulares. Además, el SIP indujo la distribución de la actina a la periferia de la célula formando el anillo de actina cortical característico del mantenimiento de la integridad de barrera endotelial (**Fig. 38 C**).

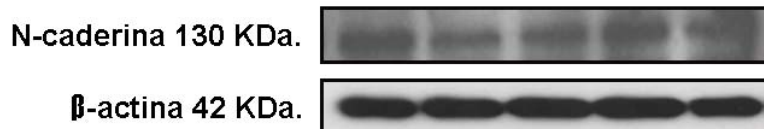
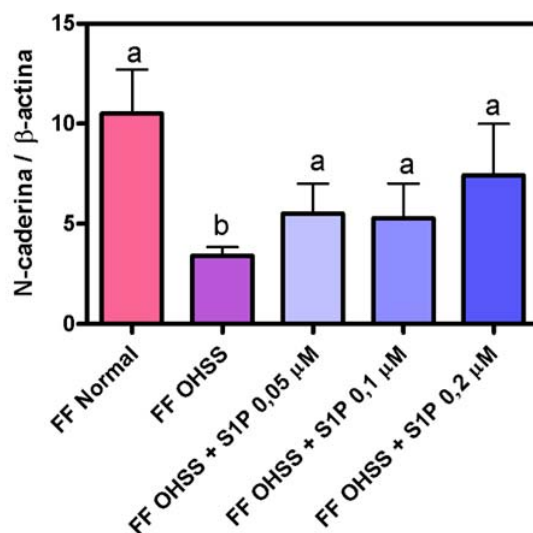


**Figura 38.** Cambios morfológicos en la organización del citoesqueleto de actina en células endoteliales en presencia de FF de pacientes con riesgo a OHSS con SIP. *Imágenes representativas de filamentos de actina teñidos con faloidina-TRITC en células endoteliales incubadas con A) FF de pacientes control, B) FF de pacientes OHSS, C) FF de pacientes OHSS en presencia de SIP (0,1  $\mu$ M). D) Imagen aumentada del grupo FF OHSS+SIP. Las flechas indican bandas corticales y los asteriscos indican fibras de estrés. Las células endoteliales cultivadas en medio de cultivo sin suero representan las condiciones basales. A, B y C magnificación 600X. Escala 50  $\mu$ m.*

**2.5. Efecto de los FF de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS incubados en presencia de S1P sobre la expresión de proteínas de uniones adherentes en células endoteliales.**

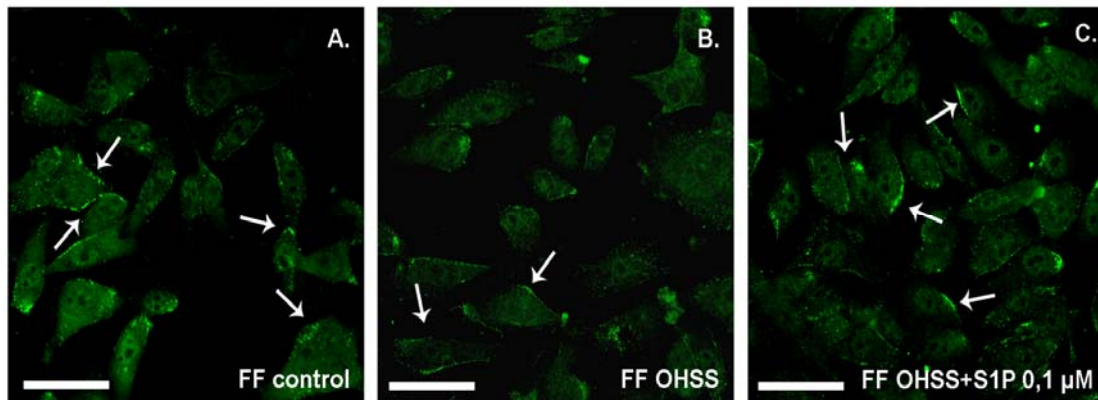
La señalización de S1P a través del receptor S1P1 en células endoteliales es importante para establecer la interacción entre estas células y los pericitos, mediante la movilización de N-caderina a dominios polarizados de la membrana plasmática en la célula endotelial, que media la unión con N-caderina presente en pericitos [144;147].

Por lo tanto, estudiamos el efecto de los FF de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS incubados en presencia de S1P sobre la expresión y la localización de N-caderina en células endoteliales. Los resultados mostraron una disminución en los niveles de N-caderina en células endoteliales incubadas con FF de pacientes OHSS respecto a FF de pacientes control ( $p < 0,05$ ). El agregado de S1P ( $0,1 \mu\text{M}$ ) aumentó estos valores a niveles comparables al grupo control ( $p < 0,05$ ) (**Fig. 39**).



**Figura 39. Efecto del FF de pacientes con riesgo a OHSS en presencia de S1P sobre la expresión de N-caderina.** Cuantificación densitométrica de N-caderina. Inmunoblots representativos se muestran en los paneles inferiores. Los datos están expresados como la media  $\pm$  SEM normalizado a  $\beta$ -actina de 3 experimentos independientes (Control,  $n= 20$  pacientes; OHSS,  $n= 19$  pacientes). Análisis de Varianza (ANOVA), seguido por el test de Dunnett's,  $a$  vs  $b$   $p<0,05$ ; comparando todas las columnas versus el grupo "FF control".

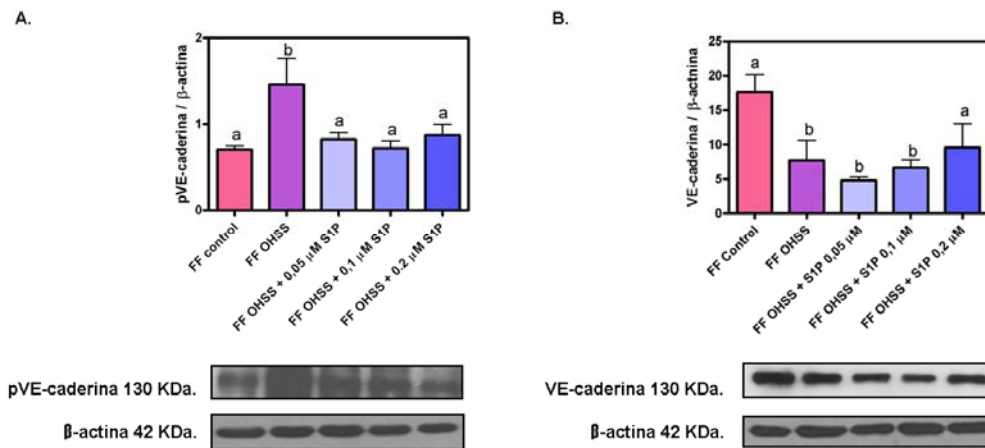
Mediante inmunofluorescencia observamos una disminución de N-caderina en la membrana plasmática en células endoteliales incubadas con FF de pacientes OHSS respecto a células endoteliales incubadas con FF de pacientes control (**Fig. 40 A - B**). El agregado de S1P ( $0,1 \mu\text{M}$ ) a FF de pacientes OHSS aumentó la localización de N-caderina en la membrana plasmática (**Fig. 40 C**).



**Figura 40. Localización de N-caderina en células endoteliales incubadas con FF de pacientes con riesgo a OHSS en presencia de S1P.** Imágenes representativas de inmunofluorescencia de N-caderina en células endoteliales incubadas con **A)** FF de pacientes control, **B)** FF de pacientes OHSS y **C)** FF de pacientes OHSS en presencia de S1P ( $0,1 \mu\text{M}$ ). Las flechas indican localización de N-caderina en membrana plasmática. Magnificación 600X. Escala  $50 \mu\text{m}$ .

Por otra parte, un mediador clave en la adhesión entre células endoteliales es la VE-caderina, la cual aumenta fuertemente en presencia de S1P [249]. Nuestros resultados mostraron que la expresión de VE-caderina total en células endoteliales incubadas con FF de pacientes OHSS disminuyó respecto al FF de pacientes controles ( $p < 0,01$ ) (**Fig. 41B**). El agregado de S1P ( $0,2 \mu\text{M}$ ) restituyó su expresión a valores control. Además, evaluamos la forma fosforilada de VE-caderina (p-VE-caderina) ya que la fosforilación en los residuos de tirosina modula la apertura de las uniones endoteliales regulando la permeabilidad vascular.

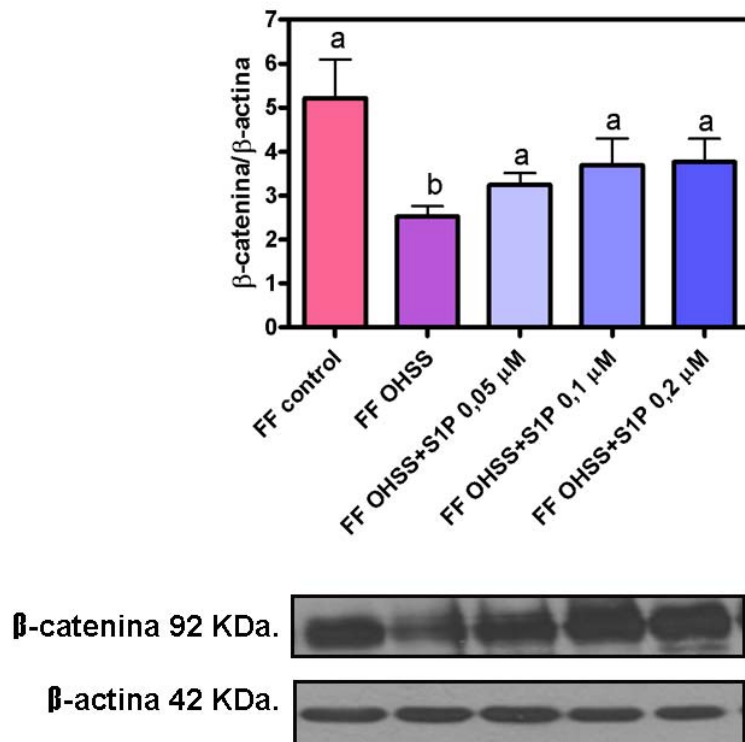
Se observó un aumento en la fosforilación de VE-caderina en las células endoteliales incubadas con FF de pacientes OHSS respecto a células incubadas con FF de pacientes control ( $p < 0,001$ ). Cuando a las células endoteliales incubadas con de FF de pacientes OHSS se las estimulaba con S1P durante 10 min se prevenía la fosforilación de VE-caderina ( $p < 0,001$ ) (**Fig. 41A**).



**Figura 41. Efecto del FF de pacientes con riesgo a OHSS en presencia de S1P sobre la expresión de VE-caderina total y fosforilada. A) Cuantificación densitométrica de VE-caderina fosforilada. B) Cuantificación densitométrica de VE-caderina total. Immunoblots representativos se muestran en los paneles inferiores. Los datos están expresados como la media  $\pm$  SEM normalizado a  $\beta$ -actina de 3 experimentos independientes (Control,  $n = 20$  pacientes; OHSS,  $n = 19$  pacientes).**

*Análisis de Varianza (ANOVA), seguido por el test de Dunnett's, a vs b  $p < 0,05$ , comparando todas las columnas versus el grupo "FF control".*

Debido a que las caderinas interactúan con componentes citoplásmáticos en la regulación de la estabilidad vascular, decidimos analizar la expresión de  $\beta$ -catenina en células endoteliales incubadas con FF de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS en presencia de S1P. Los niveles de  $\beta$ -catenina en células endoteliales incubadas con FF OHSS disminuyó comparado al grupo control ( $p < 0,05$ ), y fue restablecido en presencia de S1P ( $p < 0,05$ ) (**Fig. 42**)

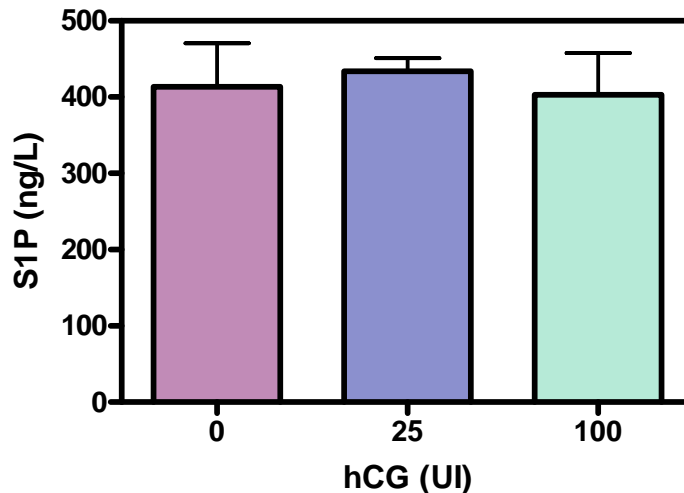


**Figura 42.** Efecto del FF de pacientes con riesgo a OHSS en presencia de S1P sobre la expresión de  $\beta$ -catenina. *Cuantificación densitométrica de  $\beta$ -catenina. Immunoblots representativos se muestran en los paneles inferiores. Los datos están*

expresados como la media  $\pm$  SEM normalizado a  $\beta$ -actina de 3 experimentos independientes (Control, n= 20 pacientes; OHSS, n= 19 pacientes). Análisis de Varianza (ANOVA), seguido por el test de Dunnett's, a vs b  $p < 0,05$ , comparando todas las columnas versus el grupo "FF control".

## 2.6. Niveles de S1P en células endoteliales inducidas con hCG

Varios estudios moleculares y clínicos demostraron que el VEGF es el principal mediador por el cual la hCG induce permeabilidad vascular en pacientes OHSS [184;217]. En el **Capítulo II**, demostramos que esta hormona también induce la expresión y liberación de ANGPT-1 en células de la granulosa luteínicas al FF. En este Capítulo estudiamos si existe una relación entre la hormona hCG y los niveles de S1P en células endoteliales. Para ello, evaluamos los niveles de S1P en el medio condicionado de células endoteliales incubadas con hCG (25 y 100 UI). Cabe destacar, que se ha demostrado que las células endoteliales poseen receptor para hCG [156;250]. Los resultados mostraron que los niveles de S1P no se modificaron al incubar las células endoteliales con diferentes concentraciones de Hcg (**Fig. 43**).



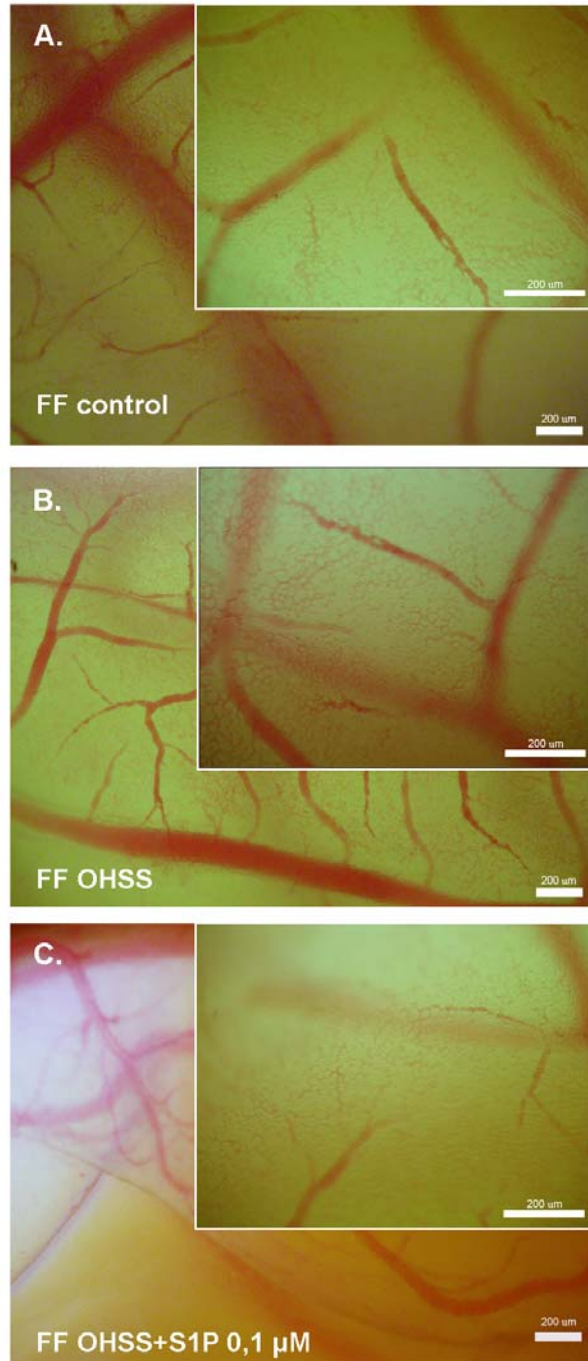
**Figura 43. Concentración de S1P en medio condicionado de células endoteliales estimuladas con hCG. Los datos están expresados como la media  $\pm$  SEM.**

**3. Efecto de los FF provenientes de pacientes sometidas a ART con riesgo a desarrollar OHSS incubados en presencia de S1P sobre la vasculatura de la CAM**

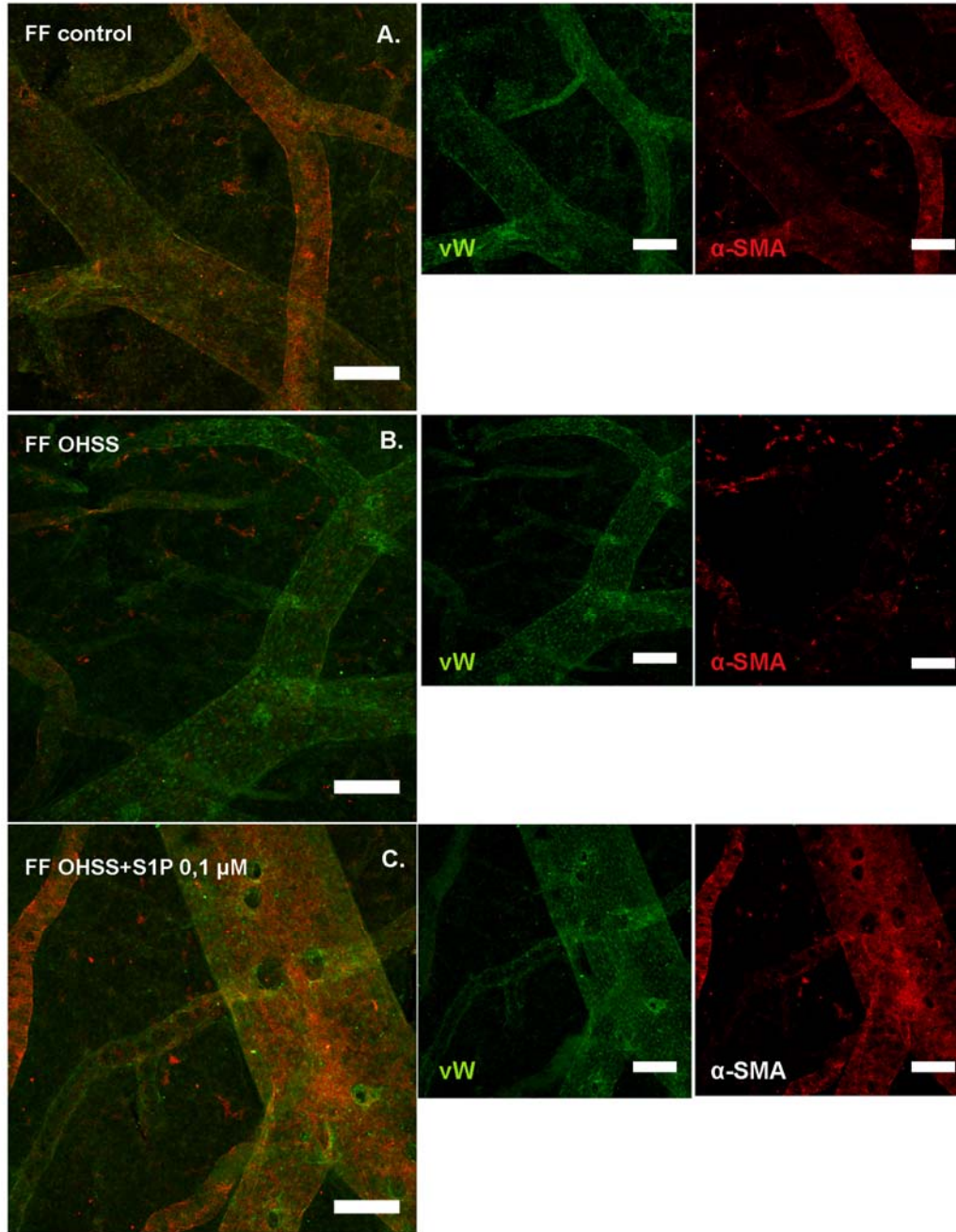
Mediante el ensayo de angiogénesis CAM estudiamos el efecto que producen los FF de pacientes OHSS en presencia de S1P sobre la vasculatura. Tal como demostramos en el *Capítulo II*, los FF de pacientes OHSS aumentan el número de ramificaciones vasculares en las CAM comparado al grupo control. Nuestros resultados mostraron que la presencia de S1P (0,1  $\mu$ M) en FF de pacientes OHSS disminuyó el número de ramificaciones vasculares y el calibre de los vasos del plexo capilar (*Fig. 44*). Además, observamos que las CAM incubadas en presencia de FF OHSS presentaban grandes áreas de hiperemia (aumento del contenido sanguíneo en respuesta a una elevada actividad metabólica). A nivel macroscópico se visualizan zonas rojizas intensas y microscópicamente se visualizan microcapilares y zonas hemorrágicas (*Fig. 44 B*).

Por otro lado, estudiamos el efecto de los FF de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS en presencia de S1P (0,1  $\mu$ M) sobre la maduración vascular. Para ello realizamos inmunofluorescencia de las áreas estimuladas y evaluamos la co-localización de células de células endoteliales (VW) y periendotheliales ( $\alpha$ -SMA) en el plexo capilar de la CAM. En presencia de FF de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS observamos una disminución en la marcación de  $\alpha$ -SMA en la CAM respecto a la misma CAM incubada con FF de pacientes control. El agregado de S1P a los FF de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS aumentó fuertemente la presencia de células periendotheliales en los vasos (*Fig. 45*).





**Figura 44.** Efecto del FF de pacientes con riesgo a OHSS en presencia de S1P sobre la angiogénesis de la CAM. Las imágenes muestran una CAM incubada en presencia de **A)** FF control, **B)** FF OHSS y **C)** FF OHSS+S1P 0,1 μM. Magnificación 100X. Escala 200 μm.



**Figura 45. Efecto del FF de pacientes con riesgo a OHSS en presencia de S1P sobre la maduración vascular en la CAM. Las imágenes muestran una CAM incubada en presencia de A) FF control, B) FF OHSS y C) FF OHSS+S1P 0,1  $\mu$ M. En verde se observan células endoteliales (vW) y en rojo células periendotheliales ( $\alpha$ -SMA). Magnificación 100X. Escala 200  $\mu$ m**

# DISCUSIÓN

El Síndrome de Hiperestimulación Ovárica (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 realiza estimulación ovárica con altas dosis de gonadotrofinas [185;186]. La forma severa es potencialmente mortal y la prevención eficaz depende de marcadores bioquímicos y clínicos confiables que se manifiesten de manera temprana durante el desarrollo de OHSS, y en la actualidad son escasos los predictores validados disponibles. Aunque los mecanismos fisiopatológicos de OHSS no están del todo claros, se sabe que este síndrome se caracteriza por tener disfunción vascular, que incluye una angiogénesis alterada y niveles elevados de moléculas vasoactivas. En particular, durante el proceso de maduración folicular y luteinización inducido por la administración de hCG, se estimula la síntesis y liberación ovárica de sustancias vasoactivas, tales como el VEGF, que aumentan la permeabilidad vascular desencadenando el síndrome. Se ha observado que los niveles séricos de VEGF aumentan luego de la administración de hCG en mujeres hiperestimuladas con riesgo a desarrollar OHSS [183;189;190]. 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 [184;191;192]. Varios autores han mostrado que el VEGF de pacientes con OHSS proviene de un ovario hiperestimulado debido a que la concentración de VEGF en fluido folicular es 100 veces mayor comparado al del suero [184;192]. Asimismo, se ha observado en mujeres que desarrollan el síndrome, que el VEGF se expresa en células de granulosa-luteínicas y se libera al fluido folicular en respuesta a hCG, aumentando la permeabilidad vascular [193].

En el *Capítulo I* de esta Tesis, planteamos la hipótesis que ***la inhibición del sistema de VEGF en la fisiopatología de OHSS afecta la angiogénesis ovárica, disminuyendo la permeabilidad vascular que conduce a la presencia de ascitis observada en este síndrome, y por consiguiente, mejora la función ovárica.***

Para llevar a cabo los objetivos propuestos se realizaron los experimentos en ratas hembras inmaduras porque no son afectadas por los cambios asociados con el ciclo estral. Además, el modelo experimental de OHSS utilizado en este estudio fue útil debido a la similitud entre la rata y el humano respecto a las características observadas

en dicho síndrome [251]. Levin y col. (1998) demostraron que la administración de hCG aumenta la permeabilidad vascular y ascitis en el modelo de OHSS en rata [193]. Por esta razón, este modelo ha sido utilizado por varios autores y por nuestro grupo de trabajo [200;215;217;218;252].

Previamente, en nuestro laboratorio, hemos demostrado que en el modelo de OHSS desarrollado en rata, el peso ovárico, los niveles de P4 y E2 séricos, la concentración de VEGF peritoneal y la expresión del principal receptor de VEGF, KDR, aumentaban respecto al grupo control [200]. Parte de estos resultados fueron ratificados en esta Tesis.

En humanos, el OHSS causa la formación de múltiples CL y aumenta los niveles de VEGF [253]. En este estudio, demostramos que en ovarios de ratas OHSS, la inhibición de VEGF por la quimera TRAP causa una disminución en el porcentaje de CL, alcanzando valores similares a las ratas de los grupos control. Estos resultados sugieren que el TRAP disminuye el porcentaje de CL, los cuales son capaces de secretar grandes cantidades de factores angiogénicos, entre ellos el VEGF, el cual estimula el proceso de angiogénesis de manera exacerbada y aumenta la permeabilidad vascular observada en las pacientes que desarrollan OHSS. Por lo tanto, la inhibición de VEGF podría mejorar este aspecto del OHSS. Además observamos una disminución en el porcentaje de folículos atrésicos en ratas OHSS comparadas al control. El tratamiento con TRAP aumentó el porcentaje de folículos atrésicos comparado a ratas OHSS. Este resultado sugiere que la inhibición de VEGF causa un aumento en los folículos atrésicos en el ovario, y por lo tanto un menor número de folículos disponibles no solo para ovular sino también como productores de moléculas vasoactivas, evitando el desarrollo del síndrome. Estos resultados son consistentes con los descriptos recientemente por Kitsou y col (2014). Estos autores demostraron que un anticuerpo neutralizante de VEGF (Bevacizumab) fue capaz de reducir el porcentaje de cuerpos lúteos y de folículos preovulatorios en el ovario proveniente de un modelo de OHSS desarrollado en rata [254]. Varios estudios han demostrado que el principal evento que causa la regresión de los CL, es la muerte de las células luteales por apoptosis [40]. En base a los resultados de la morfología ovárica descriptos anteriormente, y sabiendo por resultados obtenidos por otros autores y por nuestro laboratorio que la inhibición de VEGF posee

un efecto apoptótico directo sobre las células del ovario [116;255], evaluamos la forma activa de la caspasa-3 en ovarios de ratas OHSS. Esta caspasa es una proteasa efectora clave involucrada en la cascada de apoptosis. Luego del tratamiento con TRAP hubo un aumento en el número de células positivas para caspasa-3 clivada en CL comparado a los grupos OHSS sin tratar. Todos estos resultados, nos estarían indicando que la disminución de los CL dada por la inhibición de VEGF, podría estar causada tanto por la regresión de los CL como por una alteración en la tasa de ovulación. Estos resultados son consistentes con un estudio previo realizado en nuestro laboratorio, donde hemos demostrado que el TRAP causó no solo un aumento en el porcentaje de folículos atrésicos sino también un aumento en el número de células apoptóticas y en la fragmentación apoptótica del ADN en ovarios de ratas tratadas con gonadotrofinas [255].

Otra característica del OHSS es el desarrollo de estructuras quísticas en el ovario. Se ha observado previamente que los ovarios de ratas OHSS tienen un alto grado de edema estromal con múltiples folículos hemorrágicos y quistes luteales [195]. En este trabajo de tesis, observamos un alto número de estructuras quísticas en ovarios de ratas OHSS, varios de los cuales mostraban grandes cantidades de glóbulos rojos. Por el contrario, encontramos un menor número de quistes en los grupos tratados con TRAP, sugiriendo que el tratamiento con TRAP mejoró el desarrollo folicular, llevando a un gran número de folículos a la atresia en lugar de formar quistes. Estos resultados son consistentes con el peso ovárico y las concentraciones séricas de  $P_4$  y  $E_2$ , ya que observamos que el TRAP disminuyó estos parámetros en nuestro modelo OHSS desarrollado en rata.

El CL es una glándula altamente vascularizada cuya densidad vascular supera la de algunos tumores [256], teniendo un 50-70% de células endoteliales y periendoteliales [47;257]. La inhibición de la actividad de VEGF puede afectar a la formación y función del CL mediante el bloqueo de la angiogénesis. En base a esto, evaluamos la densidad endotelial del CL a las 48 y 72 horas luego del tratamiento con TRAP en secciones de ovarios de ratas OHSS. La inhibición de VEGF por TRAP resultó en una disminución del área positiva para lectina (marcador de célula endotelial) en tejido luteal comparado al grupo OHSS sin tratar. Esto sugiere que el TRAP causa una disminución en el

número de células endoteliales, y por lo tanto una disminución del número de CL llevando a una reducción en la concentración de P4 en suero de ratas OHSS. Este resultado es consistente con los observados por *Fraser y col.* (2006), quienes mostraron que la inhibición in vivo de VEGF disminuye la concentración de P4 en monas [258]. Dado que el VEGF actúa principalmente a través del receptor KDR [49;86], estudiamos la expresión y la fosforilación de este receptor en nuestro modelo OHSS. Observamos un aumento en la fosforilación y expresión de KDR en el grupo OHSS comparado al grupo control. Además, demostramos por primera vez que la administración de un inhibidor de VEGF fue capaz de revertir estos parámetros. Estos resultados sugieren que el tratamiento con TRAP afecta no solo la expresión de KDR sino también su activación debido a la ausencia de VEGF biodisponible. Estos cambios observados en el receptor KDR luego del tratamiento con TRAP podrían deberse a una baja expresión del receptor en el ovario. Además, el VEGF regula la expresión de su propio receptor en el ovario de ratas de nuestro modelo OHSS. Esta regulación ha sido descrita en otros tejidos [259;260].

Se ha visto, que el VEGF activa la vía PI3K/AKT en diferentes tipos celulares, como células ováricas, células endoteliales y células de músculo liso, a través del receptor KDR [73;261;262]. En este trabajo, observamos un aumento de la fosforilación de AKT en nuestro modelo OHSS en rata. El TRAP disminuyó la fosforilación de AKT. Todos estos resultados demuestran fehacientemente que el TRAP actúa de manera efectiva inhibiendo al sistema de VEGF en el modelo OHSS desarrollado en rata.

Se sabe que VEGF es el principal mediador por el cual la hCG aumenta la permeabilidad vascular que lleva a la presencia de ascitis en pacientes OHSS [195]. Una forma de estudiar permeabilidad vascular en el modelo OHSS en rata es mediante la administración de marcadores fluorescentes (NaFlu) y observación de las regiones de extravasación en el ovario por microscopia confocal. En este trabajo, encontramos un aumento de las áreas de extravasación de NaFlu en ovarios de ratas OHSS, que abarcaban zonas vasculares tanto de la teca de folículos en desarrollo como de cuerpos lúteos comparados a ovarios de ratas control. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Kitajima y col., que demostraron que la administración de altas dosis de gonadotrofinas aumenta la permeabilidad vascular detectada por la extravasación del

colorante Evans blue [217]. La inhibición de VEGF redujo las áreas de extravasado de NaFlu a ambos tiempos de tratamiento. Además, mediante un modelo in vitro de OHSS (cultivo de células endoteliales humanas), Albert y col (2002) mostraron que en presencia de hCG, la inhibición de VEGF por un anticuerpo neutralizante disminuía la permeabilidad vascular [156].

En el ovario, las uniones intercelulares median la adhesión, comunicación y permeabilidad entre células esteroideogénicas y endoteliales [55;263]. La señalización de VEGF causa la redistribución de proteínas de uniones estrechas y la pérdida de la arquitectura de la barrera endotelial [264]. En base a esta información, analizamos la expresión de claudina-5 y ocludina, dos de las principales proteínas de uniones estrechas en el modelo OHSS en rata [58;265-267]. Observamos que la expresión de claudina-5 disminuye en el grupo OHSS, lo cual podría llevar a un aumento de la permeabilidad vascular como resultado de la alteración de la arquitectura de la barrera endotelial. Este resultado es consistente con lo observado por Kitajima y col. (2006) que describe una disminución en la expresión de claudina-5 en ovarios de ratas que desarrollan OHSS [252]. En nuestro estudio, el TRAP previno esta disminución de claudina-5 en ambos tiempos de tratamiento. En cuanto al efecto de TRAP sobre la expresión de ocludina, encontramos que la inhibición de VEGF aumentó la expresión de esta proteína de uniones estrechas comparado al grupo OHSS sin tratar. Estos hallazgos sugieren que el tratamiento de TRAP es capaz de restaurar los niveles de claudina-5 y ocludina, contribuyendo a restablecer la barrera endotelial y por ende, a disminuir la permeabilidad vascular en el ovario observada en este síndrome. Consistente con estos resultados, en la vasculatura de mona, Rodewald y col (2009), demostraron que la inhibición de VEGF, aumenta la expresión de claudina-5 y ocludina sellando los espacios intercelulares, el cual afecta el transporte paracelular y por lo tanto, previniendo que los precursores hormonales lleguen a las células luteales [268]. Cabe notar, que en el futuro la administración de anticuerpos dirigidos contra proteínas claves de uniones estrechas endoteliales representará una posible estrategia terapéutica para la prevención y tratamiento de OHSS. Finalmente, para descartar la posibilidad de que la inhibición de VEGF afecta la funcionalidad del endometrio, estudiamos la histología y la proliferación celular de este tejido en el modelo OHSS. No encontramos cambios



significativos en la proliferación epitelial entre los grupos experimentales. Estos resultados, junto con los observados por análisis histológico, sugieren que la inhibición local de VEGF no altera al endometrio. Este resultado es promisorio ya que el TRAP no tendría efectos colaterales sobre el endometrio, considerando que las pacientes sometidas a ART desean un embarazo exitoso.

Cabe mencionar que varios estudios clínicos han demostrado la eficiencia de la inhibición de VEGF mediante el uso de un receptor soluble “decoy” en otros desordenes. Por ejemplo, Gharbiya y col. (2014) y Chang y col. (2014) han mostrado el efecto del inhibidor de VEGF, Aflibercept (*VEGF Trap, Regeneron-Bayer*), sobre la degeneración macular asociada a la edad [269;270] y en estudios clínicos combinados a quimio y radioterapia en cáncer [271].

En resumen, en esta parte del trabajo, demostramos que la inhibición de VEGF ejerce diversas acciones sobre el ovario de ratas que desarrollaron OHSS. Por un lado, el TRAP disminuyó la concentración sérica de E2 y P4, el porcentaje de CL y quistes, la proliferación celular, la permeabilidad vascular, el área endotelial y la fosforilación y expresión de KDR en ovarios de ratas OHSS. Por otro lado, el TRAP aumentó la apoptosis luteal y la expresión de proteínas de uniones estrechas, claudina-5 y ocludina en el grupo mencionado anteriormente. En conclusión de esta primer parte, los resultados sugieren que el tratamiento con TRAP podría prevenir la aparición temprana de OHSS y disminuir su severidad sin afectar la calidad del endometrio.

Durante el proceso de angiogénesis, varios sistemas colaboran en forma coordinada y complementaria en la regulación de la permeabilidad vascular como es el sistema del VEGF, el sistema de ANGPTs, el sistema del *factor de crecimiento derivado de plaquetas* (PDGF) y el sistema de S1P [147;212-214]. Se ha demostrado que el VEGF es uno de los principales candidatos involucrados en la patogénesis de OHSS, induciendo la permeabilidad vascular y por consiguiente, la presencia de ascitis en las pacientes [184;215]. Sin embargo, hasta ahora, no existe ningún estudio que haya evaluado la participación del sistema de ANGPTs. La ANGPT-1 actúa en forma coordinada y complementaria al VEGF, jugando un papel más tardío en el desarrollo vascular. El sistema de ANGPTs es crítico para el normal desarrollo, maduración y estabilización de la vasculatura en desarrollo [95], como también para promover la quiescencia e integridad estructural de la vasculatura adulta [272]. Sin embargo, además de la función estabilizante, la ANGPT-1 estimula la remodelación y la angiogénesis [97]. En un trabajo previo en nuestro laboratorio demostramos que en el modelo OHSS desarrollado en rata, la expresión de ANGPT-1 en el CL se encuentra aumentada respecto a CL de ratas control [200].

En base a estas consideraciones, en el **Capítulo II** de esta Tesis, planteamos la hipótesis de que ***la inhibición del sistema de ANGPTs en la fisiopatología de OHSS afecta la angiogénesis ovárica disminuyendo la permeabilidad vascular que conduce a la presencia de ascitis observada en este síndrome, y por consiguiente, mejora la función ovárica.***

En primer lugar, decidimos evaluar si el sistema de ANGPTs se encontraba involucrado en el desarrollo de OHSS. Para ello, utilizando nuestro modelo de OHSS en rata estudiamos los niveles ováricos de ANGPT-1, ANGPT-2 y el receptor de membrana Tie-2. Los niveles de ANGPT-2 se mantuvieron sin cambios en ovarios de grupo OHSS. A pesar de que no se observaron diferencias significativas, se encontró una tendencia hacia niveles aumentados de ANGPT-1 en este grupo y un aumento significativo del Tie-2. El aumento en los niveles del receptor Tie-2 permite mayor unión al ligando y una mayor activación de la señal intracelular, que a su vez, favorece la angiogénesis en esta síndrome.

Habiendo demostrado la participación del sistema de ANGPTs en nuestro modelo OHSS en rata, decidimos estudiar este sistema angiogénico en pacientes con riesgo a desarrollar OHSS. Demostramos que los niveles de ANGPT-1 en FF de mujeres con riesgo a desarrollar OHSS son más altos que en las mujeres normales. Sin embargo, los niveles del receptor Tie-2 soluble (Tie-2s) no se modificaron en FF de mujeres con riesgo a OHSS. Además, encontramos que los niveles de ANGPT-1 están aumentados y los niveles de ANGPT-2 permanecen constantes en cultivos de células de granulosa luteínicas provenientes de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS. Teniendo en cuenta que no se observó la presencia del receptor de membrana Tie-2 en estas células, nuestros resultados sugieren que la ANGPT-1 sintetizada en las células de granulosa luteínicas actúa de manera parácrina en células endoteliales y teca del compartimiento tecal del folículo y en el estroma ovárico. Vale la pena mencionar que hemos demostrado anteriormente en ratas, la presencia de Tie-2 sólo en células de la teca y endoteliales, sin detectar su expresión en células de la granulosa de diferentes estadios foliculares [116]. Por otro lado, el receptor Tie-2 soluble es secretado por células foliculares y endoteliales y actúa como un receptor antagonista secuestrando ANGPT-1 libre [273]. Nuestros resultados sugieren que hay grandes cantidades de ANGPT-1 disponible para unirse al receptor de membrana Tie-2, lo cual a su vez podría estimular la angiogénesis fisiopatológica observada en pacientes con riesgo a desarrollar OHSS. Parte de estos resultados es consistente con lo observado por Molskness y col (2006) que encontraron que los niveles de ANGPT-2 en suero de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS no variaban 36 h post administración de hCG [274]. Además, los niveles séricos de Tie-2 soluble se mantuvieron sin cambios durante el proceso de estimulación folicular y la fase lútea. Nuestros resultados, junto con los resultados descritos por otros, sugieren un papel importante de la ANGPT-1 y la ANGPT-2 en la angiogénesis ovárica fisiológica y patológica, tal como es el caso del OHSS. Además, estos resultados muestran claramente una actividad biológica mayor del sistema de ANGPTs/Tie-2 en este modelo de rata de OHSS que es consistente con los resultados obtenidos en FF de mujeres con alto riesgo de desarrollar el síndrome.

Varios autores han observado que los niveles de VEGF en suero y FF se incrementan significativamente en las pacientes que desarrollaron OHSS en

comparación con pacientes controles [192;275]. Cabe señalar que los niveles de VEGF en FF son 10 veces mayores que los detectados en el plasma de pacientes con OHSS, lo que sugiere que el sitio dominante de la producción de este factor angiogénico es el ovario. El balance entre ANGPT-1/ANGPT-2 y la expresión de VEGF son importantes para la angiogénesis y la regresión de los vasos sanguíneos [276-278]. En este trabajo observamos un aumento en los niveles de ANGPT-1 sin observarse cambios en los niveles de ANGPT-2 en FF de pacientes que presentaron síntomas de OHSS.

Durante el proceso de angiogénesis se requiere de la proliferación y la migración de células endoteliales para formar nuevos vasos. La ANGPT-1 es parte responsable de la migración de células endoteliales a través de su receptor Tie-2 e involucra la señalización por PI3K, Dok-R, Rho, GTPasas y la familia de Rac [117;279-281]. Con respecto a este punto, se analizó el efecto de ANGPT-1 sobre la angiogénesis ovárica en pacientes con riesgo a desarrollar OHSS. Para este fin, se evaluó el efecto de FF sobre la migración de células endoteliales en presencia de un anticuerpo neutralizante anti ANGPT-1. Los resultados mostraron que FF de pacientes con riesgo a OHSS estimularon la migración de células endoteliales en un grado mayor que FF de pacientes control. Sin embargo, la incubación de FF de pacientes con riesgo a OHSS en presencia de anticuerpo anti ANGPT-1 resultó en una disminución en la migración celular comparada a la obtenida en ausencia del anticuerpo. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Agrawal y col (1999) sobre la angiogénesis ovárica excesiva en pacientes OHSS. Estos autores mostraron que dentro de los vasos sanguíneos del estroma ovárico, las velocidades del flujo sanguíneo son más altas en las mujeres que desarrollan OHSS respecto a aquellas que no lo hacen [184].

Todos estos resultados nos llevan a pensar que los niveles aumentados de ANGPT-1 observados en OHSS causan una falla de la regulación en el balance del sistema vascular. Sin embargo, una de las funciones de la ANGPT-1 es mediar la estabilidad del endotelio microvascular. Este factor angiogénico está involucrado en la maduración vascular, sin embargo, requiere de la acción complementaria de otros factores angiogénicos para lograrlo, tales como el sistema del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron la expresión de los principales miembros del sistema PDGF en el desarrollo del

síndrome. Los resultados mostraron que los niveles de PDGF-B y -D se encuentran disminuidos en ovarios provenientes del grupo OHSS [282]. Además, recientemente como resultados preliminares hemos obtenidos los mismos resultados en FF de pacientes OHSS comparado a FF de pacientes normales. Todas estas observaciones indicarían que los vasos sanguíneos formados en exceso se encuentran inestables e inmaduros en el ovario de pacientes OHSS.

La integridad del citoesqueleto es crítica para mantener la barrera endotelial. Un aumento en la permeabilidad endotelial a solutos y agua es dependiente de la forma de la célula, determinado por cambios en los filamentos de actina [283] y por una desorganización en las uniones intercelulares [284]. Un mecanismo importante que regula la integridad de las uniones entre células es la distribución de actina cortical. En este estudio, observamos que los FF de pacientes con riesgo a OHSS en el cultivo endotelial inducían una fuerte remodelación de los filamentos de actina, formando fibras de estrés que entrecruzaban a lo largo del citoplasma de la célula. La preincubación de FF con un anticuerpo neutralizante anti ANGPT-1 disminuyó la redistribución de actina en células endoteliales. Este resultado sugirió que la concentración de ANGPT-1 en FF de estas pacientes fue parcialmente responsable de los cambios morfológicos dentro de las células endoteliales. Estos estudios son consistentes con los datos obtenidos por Chen *y col.* (2010) que demostraron que el FF de pacientes OHSS inducía la redistribución de los filamentos de actina, comparado a la morfología de células endoteliales incubadas con FF de pacientes normales [282;285]. Dado que la reorganización de los filamentos de actina son un prerrequisito para la migración celular y la angiogénesis, [286;287] nuestros resultados mostraron que en presencia de FF de pacientes OHSS las células endoteliales cambiaron su forma para migrar y formar nuevos vasos sanguíneos.

Como se mencionó anteriormente, un aumento en la permeabilidad endotelial es generalmente acompañada por una reorganización de las proteínas de uniones intercelulares, provocando la apertura transitoria de las uniones entre células endoteliales y la subsecuente permeabilidad paracelular. Por lo tanto, basándonos en este concepto, propusimos que las proteínas de uniones estrechas y adherentes están reguladas por la unión de ANGPT-1 a su receptor en células endoteliales. Las uniones

estrechas constituyen cerca del 20% del total de complejos de unión en células endoteliales [288]. La claudina-5 es una de las principales proteínas transmembrana de este tipo de unión [289]. Esta proteína se une a componentes intracelulares que a su vez interaccionan con los filamentos de actina [290]. En este trabajo, observamos que los niveles de claudina-5 disminuyeron en células endoteliales incubadas con FF de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS comparado a el agregado de FF de pacientes control. En cambio, la inhibición de ANGPT-1 no solo aumentó los niveles de claudina-5 comparado a los obtenidos con los FF de pacientes OHSS sino que también revirtió a niveles similares a los de los FF de pacientes control. Estos resultados sugieren que en pacientes con riesgo a OHSS, la ANGPT-1 podría ser en parte responsable de la disminución de la expresión de claudina-5. También, nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Kitajima y col. (2006), quienes demostraron la participación de claudina-5 en el modelo OHSS en rata. Estos autores observaron que una disminución de la expresión de claudina-5 es clave en el aumento de la permeabilidad vascular [252]. En esta Tesis, también se demuestra que los niveles de ZO-1 en las células endoteliales incubadas con FF de pacientes OHSS fueron inferiores a los del grupo control. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Levin y col (1998), quienes demostraron que FF de pacientes que sufren OHSS de grado severo induce la degradación de ZO-1 [193]. No se encontraron cambios en los niveles de ZO-1 después de la preincubación de FF de las mujeres con riesgo a OHSS con el anticuerpo neutralizante ANGPT-1. Esta observación sugiere que la ANGPT-1 no está involucrada en la regulación de ZO-1 en pacientes OHSS. Sin embargo, no podemos descartar un posible efecto de ANGPT-1 en otras proteínas intracitoplásmicas como ZO-2 y -3, que también están involucradas en las uniones estrechas en células endoteliales.

Además de la claudina-5 y ZO-1, otras proteínas están implicadas en la regulación de la permeabilidad endotelial. Las uniones adherentes se componen de proteínas de la familia de las caderinas. Las células endoteliales expresan una caderina llamada endotelial vascular (VE)-caderina, que se une a cateninas. VE-caderina juega un papel importante en el control de la integridad vascular y la permeabilidad [54].

En este estudio, analizamos la expresión de VE-caderina y fosfo- $\beta$ -catenina (Ser675, forma activa) en las células endoteliales incubadas con FF de pacientes con riesgo a OHSS. La incubación con FF de pacientes OHSS mostró una disminución significativa en el contenido de VE-caderina en las células endoteliales. La preincubación del FF de pacientes OHSS con el anticuerpo neutralizante contra ANGPT-1 restauró los niveles de VE-caderina a valores controles. El FF de pacientes con OHSS causó un aumento en los niveles de la forma fosforilada de  $\beta$ -catenina en las células endoteliales, comparado a pacientes control. El bloqueo de ANGPT-1 en FF OHSS restauró los niveles de  $\beta$ -catenina fosforilada a los valores normales. En conjunto, estos resultados muestran que los niveles aumentados de ANGPT-1 en pacientes con alto riesgo a desarrollar OHSS alteran las proteínas de uniones estrechas y adherentes, lo cual afecta la interacción entre las células endoteliales, y por ende, pueden conducir a un aumento de la permeabilidad vascular. Estos resultados son consistentes con observaciones realizadas por otros autores respecto a la relación entre la VE-caderina y las uniones estrechas [291;292]. La disminución de la VE-caderina en membrana plasmática se correlaciona con la desorganización de las uniones endoteliales mencionadas anteriormente. Además, el ARNm de la claudina-5 es regulado negativamente en células endoteliales que carecen de expresión de la VE-caderina. Es decir, cuando esta proteína se encuentra en las uniones adherentes de las células endoteliales, tanto la  $\beta$ -catenina como el factor de transcripción FoxO no pueden adherirse al promotor de la claudina-5 e inhibir su expresión. Por lo tanto, la VE-caderina modula directamente la expresión de la claudina-5 y por consiguiente, la organización y la maduración de las uniones estrechas [291;292]. Respecto a este punto, Hino y col., (2005) mostraron que la  $\beta$ -catenina es estable cuando es fosforilada en Ser675 por la proteína kinasa, evitando la ubiquitinización e induciendo la traslocación de la  $\beta$ -catenina al núcleo. Luego esta proteína fosforilada se acumula en el núcleo, regulando la transcripción de varios genes [293].

El ensayo CAM es una etapa intermedia entre el cultivo *in vitro* y experimentos con animales *in vivo* [163] y se utiliza ampliamente para estudiar la angiogénesis en el tumor [157] y los tejidos del endometrio [158]. Las CAM también se han utilizado para el estudio de cultivo de piel humana [159], para la investigación de la cirugía de la

retina [294], y para evaluar diferentes biomateriales en la ingeniería de tejidos [161]. En este trabajo, hemos utilizado por primera vez el sistema CAM en la codorniz (*Japanese quail*) para evaluar el potencial angiogénico de los FF de las pacientes OHSS. Observamos que FF de pacientes con riesgo a OHSS aumentaron la actividad angiogénica en las CAM comparado a pacientes controles, y que este efecto se revirtió con el agregado de un anticuerpo anti ANGPT-1 a este FF. Adicionalmente, se observó un aumento de los niveles de la integrina  $\alpha v \beta 3$  en CAM incubadas con FF de pacientes OHSS en comparación con las pacientes control. Sin embargo, la inhibición de la ANGPT-1 en FF de pacientes OHSS disminuyó los niveles de esta integrina en las CAMs. Estos resultados sugieren que los niveles elevados de ANGPT-1 en FF de pacientes OHSS observados podrían ser en parte responsables de la desregulación del equilibrio del sistema vascular. Además, nosotros consideramos que el ovario en pacientes OHSS es una de las principales fuentes no solo de VEGF sino también de ANGPT1 siendo capaces de atravesar la membrana basal para llegar al flujo sanguíneo.

En resumen en esta segunda parte de la Tesis, demostramos que concentraciones aumentadas de ANGPT-1 en FF de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS en el día de la punción folicular y recuperación ovocitaria, podría ser un marcador no esteroideo importante para el OHSS. Además, los resultados descritos en relación con la migración de células endoteliales y la regulación de proteínas de uniones intercelulares, pueden proporcionar nuevos conocimientos sobre los mecanismos por los cuales la ANGPT-1 tiene efecto sobre los trastornos del ovario, tales como el OHSS.



La angiogénesis ovárica juega un papel fundamental en la secuencia de eventos que llevan al desarrollo de los folículos y a la formación del cuerpo lúteo. Varios factores angiogénicos como el VEGF, FGF y ANGPT-1 han sido identificados en FF y sus concentraciones correlacionan positivamente con la concentración de gonadotrofinas, la maduración ovocitaria y a altas tasas de fertilización [295-297]. Sin embargo, en el FF también se han identificado otras moléculas no proteicas con funciones reguladoras de la angiogénesis. Von Otte y col., 2006 demostraron por primera vez la presencia del esfingolípid S1P asociado a partículas de HDL en el FF de pacientes normales y su capacidad de estimular la formación de nuevos vasos sanguíneos [152].

Como vimos anteriormente, el aumento en la permeabilidad vascular es la principal característica observada en pacientes con OHSS. Por otro lado, S1P es un factor que mantiene la integridad de la barrera endotelial, a través de su unión al receptor S1P1 [298-303]. Estos antecedentes nos llevaron a plantear la hipótesis del **Capítulo III** de esta Tesis. Postulamos que *los niveles del S1P se encuentran disminuidos en pacientes con riesgo a desarrollar OHSS, siendo en parte responsables de la alta permeabilidad vascular observada en estas pacientes.*

En primer lugar determinamos los niveles de S1P en FF de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS. Observamos una disminución en los niveles de S1P en FF de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS respecto a pacientes normales. Teniendo en cuenta este resultado, estudiamos el efecto de los FF sobre la expresión del receptor S1P1 en un cultivo de células endoteliales. Ha sido demostrada la importancia del receptor S1P1 para el normal funcionamiento vascular. La delección de S1P1 en ratones provoca muerte embrionaria debido a severas hemorragias a causa de un defecto en el proceso de estabilización vascular [304]. El mismo fenotipo se obtiene en ratones deficientes de S1P1 exclusivamente en células endoteliales, mientras que ratones deficientes en S1P1 en células de músculo liso vasculares son normales [304]. Por lo tanto, la señalización a partir de S1P/S1P1 en células endoteliales es importante para la homeostasis de la pared del vaso y el normal funcionamiento de los órganos. En particular, en el ovario humano, S1P1 se expresa levemente en el estroma y en células endoteliales que rodean a los vasos [305]. Por otra parte, las células de granulosa

luteínicas humanas expresan S1P3. La unión del S1P asociado al HDL-FF estimula su migración a través de la activación de Rac1, promoviendo la formación del cuerpo lúteo [153]. Es por esto que decidimos analizar la expresión de S1P1 en células endoteliales incubadas con los FF. La expresión del receptor fue significativamente menor en células endoteliales incubadas con FF respecto a células endoteliales incubadas en presencia de FF normal. En cambio, el agregado de concentraciones fisiológicas de S1P (0,1  $\mu$ M) restituyó los valores obtenidos con FF normales. Estos resultados estarían indicando que una disminución en los niveles de S1P en FF de pacientes OHSS estaría inhibiendo la expresión de su propio receptor en células endoteliales, lo que llevaría a la pérdida del mantenimiento de la barrera endotelial.

La esfingosina 1-fosfato liasa (SPL) es una enzima intracelular inducible por estrés y es responsable de la degradación irreversible de S1P a fosfoetanolamina y hexadecanal. Por lo tanto, esta enzima se considera que es un punto importante de control para regular las concentraciones de S1P en las células [306]. De hecho, ratones transgénicos deficientes en SPL presentan un aumento pronunciado de los niveles de S1P en los tejidos y suero [246;307;308]. En el presente trabajo demostramos que la expresión de SPL en células endoteliales incubadas en presencia de FF de pacientes con riesgo a OHSS aumentaba respecto a células endoteliales incubadas con FF de pacientes control. Sin embargo, el agregado de S1P fue capaz de disminuir la expresión de la enzima que lo degrada. Recientemente, varios estudios demostraron la una de las posibles causas de la disminución de S1P en diversas patologías es el aumento en la SPL. Esto fue descrito en modelos animales de isquemia cardíaca [307], lesión pulmonar aguda [308] y en cáncer de mama humano [309]. Bandhuvula y col. (2011) demostraron que la isquemia cardíaca induce la activación de SPL, y que la inhibición de esta enzima reduce su actividad, aumentando los niveles de S1P, reduciendo el tamaño del infarto y aumentando la recuperación funcional [307]. En un modelo animal de lesión pulmonar aguda, los niveles de SPL se encuentran aumentados y los niveles de S1P disminuidos. La inhibición de SPL produce un aumento de los niveles de S1P, y protección contra la liberación de citoquinas, la inflamación y contra la disfunción de la barrera endotelial [308]. En base a estas observaciones, nuestros resultados estarían indicando que en células endoteliales incubadas con FF de pacientes OHSS el aumento

en la expresión de SPL estaría llevando a una disminución de los niveles de S1P, y podría contribuir en parte a la alta permeabilidad vascular característica de este síndrome. Actualmente, en nuestro laboratorio se están llevando a cabo estudios para evaluar no solo la expresión de la quinasa que forma S1P sino también de la fosfatasa que lo degrada en forma reversible.

La migración de células endoteliales es esencial para el proceso de angiogénesis. En el **Capítulo II** demostramos que el FF de pacientes con riesgo a OHSS aumenta la migración de células endoteliales respecto a la inducida por FF de pacientes control. El agregado de S1P a FF de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS disminuyó la migración de las células endoteliales a valores inducidos por pacientes control. Aunque en muchos sistemas S1P promueve la migración celular [154;249;310], existen evidencias que el S1P también desencadena la reorganización del citoesqueleto que lleva a la inhibición de la migración celular [311;312].

El citoesqueleto de las células endoteliales es un determinante crítico de la integridad vascular y la regulación de la barrera endotelial [299;313;313;314]. En nuestro trabajo demostramos que las células endoteliales incubadas con FF de pacientes con riesgo a OHSS más el agregado de S1P produjo un aumento rápido de la polimerización de los filamentos de actina formando un anillo de actina cortical. Además, el S1P evitó la formación de fibras de estrés ubicadas transversalmente a lo largo del citoplasma de la célula observada en el grupo OHSS. La activación de Rac1 por S1P es fundamental para la formación de este anillo cortical [315]. Entre los efectos que media el S1P en células endoteliales, la quimiotaxis y la integridad vascular son dependientes de la reorganización del citoesqueleto. Por lo tanto, nuestros resultados estarían indicando que el agregado de S1P en FF de pacientes con riesgo a OHSS lleva a la formación del anillo cortical, siendo éste el fenotipo para la estabilización vascular, más que para la migración celular.

La señalización de S1P a través del receptor S1P1 en células endoteliales es importante para establecer la interacción entre estas células y los pericitos, mediante la movilización de N-caderina a dominios polarizados de la membrana plasmática en la célula endotelial, que media la unión con N-caderina presente en pericitos [144;147]. En

este trabajo, los FF de pacientes con riesgo a OHSS disminuyeron la expresión de N-caderina en células endoteliales respecto a las incubadas con FF de pacientes control. El agregado de S1P en FF de pacientes con riesgo a OHSS aumentó la expresión de N-caderina en este tipo celular. Además, por inmunofluorescencia observamos que la N-caderina en células endoteliales incubadas con FF de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS perdían su localización en membrana plasmática mientras que el agregado de S1P a FF de pacientes OHSS mantenía la localización de la caderina en dicha membrana. Este resultado es consistente con los obtenidos respecto a la formación del anillo de actina cortical en presencia de S1P, ya que la polimerización de los filamentos de actina inducida por S1P es responsable del correcto tráfico de N-caderina a los dominios polarizados de la membrana plasmática, crítico para la adhesión de las células endoteliales con las células murales, necesarias para la estabilización vascular [144].

S1P también es capaz de mejorar la integridad de la barrera endotelial a través del receptor S1P1 activando la vía de Rac1 y la formación de uniones adherentes [299]. Durante el proceso del aumento de la barrera endotelial, S1P induce la reorganización del esqueleto, y la distribución, ensamblaje y estabilización de las uniones adherentes. VE-caderina es la proteína estructural más importante de las uniones entre células endoteliales. En células HUVEC confluentes, S1P aumenta significativamente la cantidad de VE-caderina y  $\beta$ -catenina en las regiones de contactos y mejora el ensamblaje de las uniones adherentes [244]. Tal como vimos en el **Capítulo II**, los FF de pacientes con riesgo a OHSS disminuyen la expresión de VE-caderina en células endoteliales comparado al FF control. En esta parte de la Tesis, demostramos que el agregado de S1P aumenta la expresión de VE-caderina en células endoteliales. En concordancia con esto, Lee y col. (1999) demostraron que la administración de S1P a células HUVEC aumentaba la localización de VE-caderina y  $\beta$ -catenina en las uniones intercelulares [244]. Nuestros resultados también demostraron que células endoteliales incubadas en presencia de FF de pacientes con riesgo de OHSS tienen menor expresión de  $\beta$ -catenina respecto a las células endoteliales incubadas con FF control. Este efecto fue revertido por el agregado de S1P a los FF de pacientes con riesgo a OHSS.

Los cambios en la dinámica del citoesqueleto y la fosforilación de VE-caderina median las adhesiones entre células. La fosforilación de VE-caderina en la tirosina 731

lleva a la separación de la  $\beta$ -catenina de su cola citoplasmática y a su posterior internalización [316]. En este trabajo, observamos mayor fosforilación de VE-caderina en células endoteliales incubadas con FF de pacientes con riesgo a OHSS respecto a pacientes control. Interesantemente, el agregado de S1P a FF de pacientes con riesgo a OHSS evitó la fosforilación de VE-caderina. Está establecido que la integridad de las uniones adherentes está regulada por la fosforilación de VE-caderina y su internalización en respuesta a la estimulación por VEGF [317-319]. En las uniones adherentes en un endotelio quiescente, KDR (VEGFR-2) es mantenido en un estado inactivo. La unión de VEGF a su receptor KDR inicia una cascada de eventos que lleva a la fosforilación de VE-caderina y al desensamble de las uniones adherentes [318]. Gaengel K. y col. (2012) estudiaron la comunicación que existe entre el sistema de VEGF y S1P. Estos autores demostraron que cuando co-estimulaban células HUVEC con VEGF y S1P, VE-caderina permanecía estable en las uniones endoteliales y eran insensibles a la internalización inducida por VEGF [146]. La administración *in vivo* de un agonista del receptor S1P1 bloquea la permeabilidad vascular inducida por VEGF, sugiriendo que el receptor para S1P es capaz de regular la permeabilidad vascular [143]. Estos datos nos estarían indicando que las uniones adherentes en las células endoteliales se encuentran bajo un control dinámico regulado por S1P. Los altos niveles de factores angiogénicos tales como VEGF y/o ANGPT-1 observados en pacientes con alta probabilidad de desarrollar OHSS alteran estas uniones en células endoteliales, contribuyendo al aumento de la permeabilidad vascular y a la extravasación de fluidos. Por lo tanto, estos resultados *in vitro* demuestran que el S1P es un agente potente y directo de la estilización del endotelio frente al ambiente fisiopatológico del OHSS. Cabe mencionar, que el S1P no solo induce proteínas claves que forman uniones adherentes sino también proteínas de uniones estrechas, favoreciendo a la integridad de la barrera endotelial. Lee y col (2006) demostraron que S1P estimula la traslocación de ZO-1 a la zona de lamelipodio y a las uniones endoteliales vía S1P1/Gi/Akt/Rac mientras que la inhibición de ZO-1 por ARN de interferencia disminuye el efecto de S1P [320]. En base a este antecedente, en nuestro laboratorio se están realizando estudios para evaluar el efecto de S1P sobre proteínas claves de uniones estrechas (claudina-5, ZO-1, ocludina, nectina) en el modelo de OHSS.

Durante años y hasta la actualidad, la hCG ha sido el mejor método para inducir la maduración ovocitaria en los protocolos de fertilización asistida. Sin embargo, la administración de hCG induce la liberación de mediadores que tienen efecto sobre el sistema vascular, el cual es el responsable de las consecuencias clínicas de OHSS y juega un rol en el desarrollo de este síndrome. Se ha observado que los niveles séricos de VEGF aumentan luego de la administración de hCG en mujeres hiperestimuladas con riesgo a desarrollar OHSS [183;189;190]. Además, en el *Capítulo II* de esta Tesis, demostramos que esta hormona también induce la expresión y liberación de ANGPT-1 en células de la granulosa luteínicas al FF. Este factor angiogénico actuaría de manera parácrina sobre las células endoteliales de la teca y del estroma ovárico induciendo la migración y estimulando la formación de nuevos vasos. Por lo tanto, en este Capítulo estudiamos si existe una relación entre la hormona hCG y los niveles de S1P en células endoteliales. Para ello, evaluamos los niveles de S1P en el medio condicionado de células endoteliales incubadas con hCG (25 y 100 UI). Cabe destacar, que se ha demostrado que las células endoteliales poseen receptor para hCG [156;250]. Además, las células endoteliales son una fuente de S1P [321]. Los niveles de S1P no variaron al incubar las células endoteliales con diferentes concentraciones de hCG. Estos resultados nos estarían indicando que los bajos niveles de S1P observados en FF de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS serían independientes de la estimulación ovárica por hCG.

Cabe destacar que actualmente se está utilizando un agonista de S1P, FTY720, en ensayos clínicos para el tratamiento de pacientes con esclerosis múltiple y para pacientes inmunosuprimidos en trasplante de órganos [322;323].

En conclusión, la disminución de S1P en FF de las pacientes con alta probabilidad de desarrollar OHSS sería en parte responsable de la pérdida de no solo de la integridad de la unión entre células endoteliales sino de la interacción de éstas con los pericitos, causando por ende, un aumento en la permeabilidad vascular. Estos resultados aportarán mayor conocimiento tanto sobre la posible administración del esfingolípido S1P a este tipo de pacientes como estrategia terapéutica como de la utilización del mismo como un biomarcador para detectar en forma temprana a las pacientes con riesgo de OHSS.

# CONCLUSIÓN GENERAL

En los últimos años, la regulación de la integridad vascular ha adquirido importancia en el campo de la fisiología y patología humana. El mantenimiento de la arquitectura de los vasos preexistentes requiere de la interacción activa entre células endoteliales, pericitos y matriz extracelular (MEC). Como hemos visto a lo largo de esta tesis, el ovario representa un muy buen modelo para evaluar no solo angiogénesis fisiológica sino también patológica. En particular, el OHSS se caracteriza por poseer una angiogénesis alterada, con niveles elevados de sustancias vasoactivas en suero, fluido peritoneal y fluido folicular. Por ende, las pacientes con OHSS desarrollan ascitis debido a una permeabilidad vascular exacerbada. En base a estos antecedentes, decidimos evaluar en este síndrome los principales sistemas que colaboran en el mantenimiento de la integridad vascular: VEGF, ANGPTs y S1P. Se utilizó no solo un modelo experimental de OHSS en rata sino también FF de pacientes OHSS. Los FF se agregaron a una línea celular endotelial como a las CAMs en presencia de inhibidores angiogénicos o esfingolípidos. Es importante notar, que a lo largo de esta tesis doctoral se utilizaron diversos modelos *in vitro* e *in vivo* para validar rigurosamente los resultados obtenidos en los distintos sistemas.

Las conclusiones de este trabajo son:

***\* La inhibición de VEGF y de ANGPT-1 altera el desarrollo de vasos y su integridad en el ovario, disminuyendo la permeabilidad vascular que conduce a la presencia de ascitis, y por consiguiente, mejorando la función ovárica en la fisiopatología del OHSS.***

***\* La disminución de S1P en FF de las pacientes con riesgo a desarrollar OHSS sería en parte responsable de la pérdida no solo de la integridad de la unión entre células endoteliales sino de la interacción de éstas con los pericitos, causando por ende, una alteración severa en la arquitectura vascular.***

En el siguiente esquema se muestra un resumen de los posibles mecanismos de acción de los factores angiogénicos descritos a lo largo de esta Tesis (**Fig. 46**).



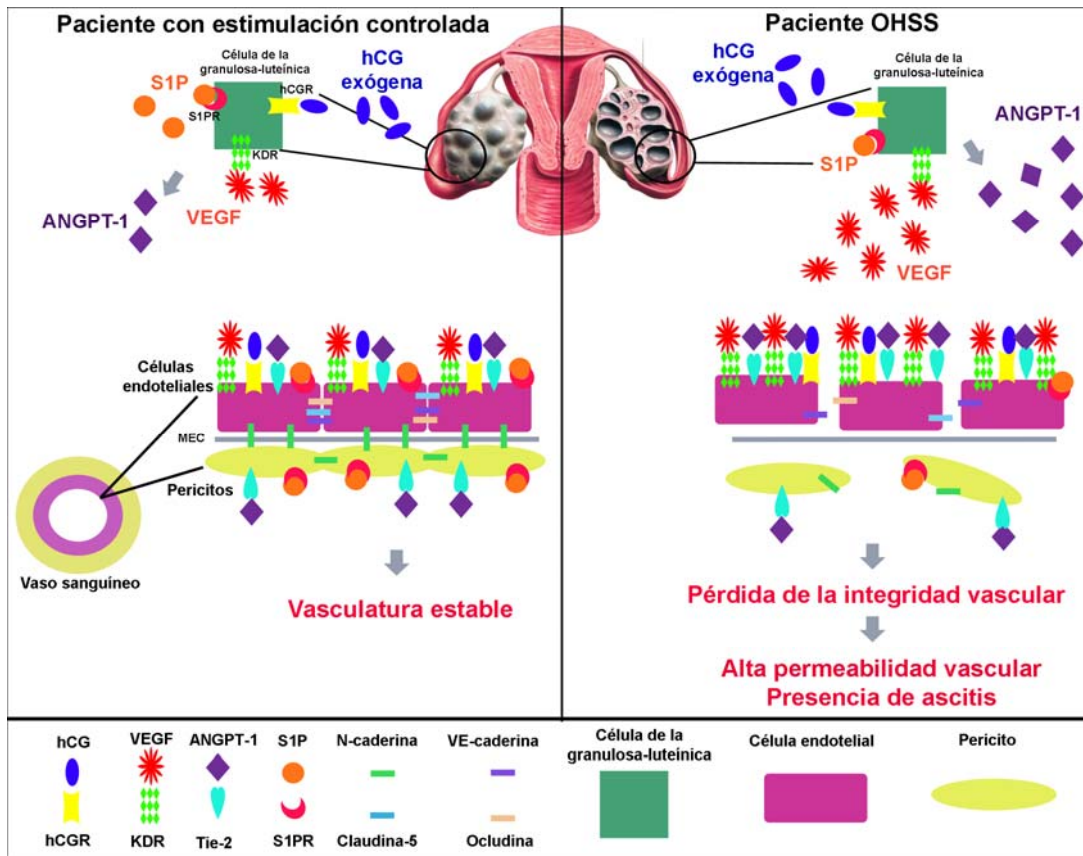


Figura 46. Esquema que muestra un resumen de los posibles mecanismos de acción del VEGF, la ANGPT-1 y el S1P en el desarrollo de OHSS.

*Por último, los resultados de esta Tesis aportan conocimientos para dilucidar la etiología de OHSS como también para detectar posibles biomarcadores (VEGF, ANGPT, S1P) que podrían ser utilizados en el futuro para prevenir el desarrollo de este síndrome y por consiguiente, ayudar a los médicos a elegir la mejor estrategia de estimulación ovárica para cada paciente.*

REFERENCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Thibault C, Levasseur M-C, Hunter RHF. *Reproduction in Mammals and Man*, English revised edition ed. 1993.
- [2] McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr. Rev.* 2000; 21: 200-214.
- [3] Maekawa A. Pathology of tumours in laboratory animals. *Tumours of the rat. Tumours of the ovary.* IARC Sci. Publ. 1990; 473-497.
- [4] Bloom W., Fawcett W.D. *Tratado de Histología*, 11<sup>aba</sup> ed. Madrid: Mc. Graw Hill - Interamericana; 1997.
- [5] McGraw Hill. *The Female Reproductive System*. In. 2009.
- [6] Irving-Rodgers HF, Rodgers RJ. Ultrastructure of the basal lamina of bovine ovarian follicles and its relationship to the membrana granulosa. *J. Reprod. Fertil.* 2000; 118: 221-228.
- [7] Peters H, Byskov AG, Lintern-Moore S, Faber M, Andersen M. The effect of gonadotrophin on follicle growth initiation in the neonatal mouse ovary. *J. Reprod. Fertil.* 1973; 35: 139-141.
- [8] Elvin JA, Matzuk MM. Mouse models of ovarian failure. *Rev. Reprod.* 1998; 3: 183-195.
- [9] Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int. Rev. Cytol.* 1991; 124: 43-101.
- [10] Adashi EY, Resnick CE, Rosenfeld RG, Powell DR, Koistinen R, Rutanen EM, Seppala M. Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-1 is an antigonadotropin: evidence that optimal follicle-stimulating hormone action in ovarian granulosa cells is contingent upon amplification by endogenously-derived IGFs. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1993; 343: 377-385.
- [11] Orisaka M, Orisaka S, Jiang JY, Craig J, Wang Y, Kotsuji F, Tsang BK. Growth differentiation factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. *Mol. Endocrinol.* 2006; 20: 2456-2468.
- [12] Geva E, Jaffe RB. Ovarian Angiogenesis. In: Leung P.C, Adashi E.Y (eds.), *The ovary*, Second ed. San Diego, California. USA: Elsevier Academic Press; 2004: 305-317.
- [13] *The Ovary*, 2nd ed. Elsevier, Academic Press; 2004.
- [14] Oxberry, A, Greenwald GS. An autoradiographic study of the binding of <sup>125</sup>I-labeled follicle-stimulating hormone, human chorionic gonadotropin and prolactin to the hamster ovary throughout the estrous cycle. *Biol Repr* 1982; 27: 505-516.

- [15] Amsterdam A, Koch Y, Lieberman ME, Lindner HR. Distribution of binding sites for human chorionic gonadotropin in the preovulatory follicle of the rat. *J. Cell Biol.* 1975; 67: 894-900.
- [16] Eppig JJ. FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. *Nature* 1979; 281: 483-484.
- [17] Dekel N, Galiani D, Sherizly I. Dissociation between the inhibitory and the stimulatory action of cAMP on maturation of rat oocytes. *Mol. Cell Endocrinol.* 1988; 56: 115-121.
- [18] Phillips DM, Dekel N. Effect of gonadotropins and prostaglandin on cumulus mucification in cultures of intact follicles. *J. Exp. Zool.* 1982; 221: 275-282.
- [19] Kumar TR, Wang Y, Lu N, Matzuk MM. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat. Genet.* 1997; 15: 201-204.
- [20] Gougeon A, Testart J. Germinal vesicle breakdown in oocytes of human atretic follicles during the menstrual cycle. *J. Reprod. Fertil.* 1986; 78: 389-401.
- [21] Zeleznik AJ, Schuler HM, Reichert LE, Jr. Gonadotropin-binding sites in the rhesus monkey ovary: role of the vasculature in the selective distribution of human chorionic gonadotropin to the preovulatory follicle. *Endocrinology* 1981; 109: 356-362.
- [22] Zeleznik AJ, Midgley AR, Jr., Reichert LE, Jr. Granulosa cell maturation in the rat: increased binding of human chorionic gonadotropin following treatment with follicle-stimulating hormone in vivo. *Endocrinology* 1974; 95: 818-825.
- [23] Wang XN, Greenwald GS. Synergistic effects of steroids with FSH on folliculogenesis, steroidogenesis and FSH- and hCG-receptors in hypophysectomized mice. *J. Reprod. Fertil.* 1993; 99: 403-413.
- [24] Vitale AM, Gonzalez OM, Parborell F, Irusta G, Campo S, Tesone M. Inhibin A increases apoptosis in early ovarian antral follicles of diethylstilbestrol-treated rats. *Biol. Reprod.* 2002; 67: 1989-1995.
- [25] Foghi A, Teerds KJ, van der DH, Moore NC, Dorrington J. Induction of apoptosis in thecal/interstitial cells: action of transforming growth factor (TGF) alpha plus TGF beta on bcl-2 and interleukin-1 beta-converting enzyme. *J. Endocrinol.* 1998; 157: 489-494.
- [26] Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL, Hsueh AJ. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology* 1991; 129: 2799-2801.
- [27] Parborell F, Pecci A, Gonzalez O, Vitale A, Tesone M. Effects of a gonadotropin-releasing hormone agonist on rat ovarian follicle apoptosis:

- Regulation by EGF and the expression of Bcl-2-related genes. *Biol. Reprod.* 2002; 67: 481-486.
- [28] Parborell F, Irusta G, Vitale AM, Gonzalez O, Pecci A, Tesone M. GnRH antagonist Antide inhibits apoptosis of preovulatory follicle cells in rat ovary. *Biol Repr* 2005; 72: 659-666.
- [29] Chun SY, Hsueh AJ. Paracrine mechanisms of ovarian follicle apoptosis. *J Reprod. Immunol.* 1998; 39: 63-75.
- [30] Tapanainen JS, Tilly JL, Vihko KK, Hsueh AJ. Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol. Endocrinol.* 1993; 7: 643-650.
- [31] Billig H, Furuta I, Hsueh AJ. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology* 1993; 133: 2204-2212.
- [32] Carson RS, Findlay JK, Clarke IJ, Burger HG. Estradiol, testosterone, and androstenedione in ovine follicular fluid during growth and atresia of ovarian follicles. *Biol. Reprod.* 1981; 24: 105-113.
- [33] Braw RH, Tsafiriri A. Effect of PMSG on follicular atresia in the immature rat ovary. *J. Reprod. Fertil.* 1980; 59: 267-272.
- [34] Chun SY, Billig H, Tilly JL, Furuta I, Tsafiriri A, Hsueh AJ. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 1994; 135: 1845-1853.
- [35] Knobil E, Neill JD. *Physiology of Reproduction*, 3 Rev Ed edition ed. 2005.
- [36] Caron MG, Goldstein S, Savard K, Marsh JM. Protein kinase stimulation of a reconstituted cholesterol side chain cleavage enzyme system in the bovine corpus luteum. *J Biol Chem* 1975; 250: 5137-5143.
- [37] Hazzard TM, Xu F, Stouffer RL. Injection of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 into the preovulatory follicle disrupts ovulation and subsequent luteal function in rhesus monkeys. *Biol Reprod.* 2002; 67: 1305-1312.
- [38] Peluffo MC, Bussmann L, Stouffer RL, Tesone M. Expression of caspase-2, -3, -8 and -9 proteins and enzyme activity in the corpus luteum of the rat at different stages during the natural estrous cycle. *Reproduction* 2006; 132: 465-475.
- [39] Carambula SF, Matikainen T, Lynch MP, Flavell RA, Goncalves PB, Rueda BR. Caspase-3 is a pivotal mediator of apoptosis during regression of the ovarian corpus luteum. *Endocrinology* 2002; 143: 1495-1501.
- [40] Stocco C, Telleria C, Gibori G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocr. Rev.* 2007; 28: 117-149.

- [41] Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1995; 11: 73-91.
- [42] Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671-674.
- [43] Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407: 242-248.
- [44] Scotti L, Abramovich D, Irusta G, Pazos C, Pascuali N, Haro Durand L, de Zúñiga Ignacio TMPF. Técnicas experimentales para el estudio de la angiogénesis en enfermedades reproductivas femeninas. *Revista de la Sociedad Argentina de Endocrinología Ginecología y Reproductiva* 2013; XX: 5-15.
- [45] Bergers G, Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro. Oncol.* 2005; 7: 452-464.
- [46] Hall AP. Review of the pericyte during angiogenesis and its role in cancer and diabetic retinopathy. *Toxicol. Pathol.* 2006; 34: 763-775.
- [47] Redmer DA, Doraiswamy V, Bortnem BJ, Fisher K, Jablonka-Shariff A, Grazul-Bilska AT, Reynolds LP. Evidence for a role of capillary pericytes in vascular growth of the developing ovine corpus luteum. *Biol Reprod.* 2001; 65: 879-889.
- [48] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
- [49] Klagsbrun M, D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1996; 7: 259-270.
- [50] Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235: 442-447.
- [51] 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: 567-575.
- [52] Reynolds LP, Grazul-Bilska AT, Killilea SD, Redmer DA. Mitogenic factors of corpora lutea. *Prog. Growth Factor Res.* 1994; 5: 159-175.
- [53] Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J. Cell Sci.* 2008; 121: 2115-2122.
- [54] Dejana E, Tournier-Lasserre E, Weinstein BM. The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Dev. Cell* 2009; 16: 209-221.
- [55] Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev.* 2004; 84: 869-901.

- [56] Gonzalez-Mariscal L, Hernandez S, Vega J. Inventions designed to enhance drug delivery across epithelial and endothelial cells through the paracellular pathway. *Recent Pat Drug Deliv. Formul.* 2008; 2: 145-176.
- [57] Groten T, Fraser HM, Duncan WC, Konrad R, Kreienberg R, Wulff C. Cell junctional proteins in the human corpus luteum: changes during the normal cycle and after HCG treatment. *Hum. Reprod.* 2006; 21: 3096-3102.
- [58] Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S. Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J. Cell Biol.* 1999; 147: 185-194.
- [59] Morita K, Sasaki H, Furuse K, Furuse M, Tsukita S, Miyachi Y. Expression of claudin-5 in dermal vascular endothelia. *Exp. Dermatol.* 2003; 12: 289-295.
- [60] Angst BD, Marcozzi C, Magee AI. The cadherin superfamily. *J. Cell Sci.* 2001; 114: 625-626.
- [61] Wallez Y, Huber P. Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 2008; 1778: 794-809.
- [62] Vestweber D, Winderlich M, Cagna G, Nottebaum AF. Cell adhesion dynamics at endothelial junctions: VE-cadherin as a major player. *Trends Cell Biol.* 2009; 19: 8-15.
- [63] Hirase T, Node K. Endothelial dysfunction as a cellular mechanism for vascular failure. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 2012; 302: H499-H505.
- [64] Hartsock A, Nelson WJ. Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim. Biophys. Acta* 2008; 1778: 660-669.
- [65] Ooshio T, Kobayashi R, Ikeda W, Miyata M, Fukumoto Y, Matsuzawa N, Ogita H, Takai Y. Involvement of the interaction of afadin with ZO-1 in the formation of tight junctions in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* 2010; 285: 5003-5012.
- [66] Takai Y, Nakanishi H. Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions. *J. Cell Sci.* 2003; 116: 17-27.
- [67] Herr D, Fraser HM, Konrad R, Holzheu I, Kreienberg R, Wulff C. Human chorionic gonadotropin controls luteal vascular permeability via vascular endothelial growth factor by down-regulation of a cascade of adhesion proteins. *Fertil. Steril.* 2013; 99: 1749-1758.
- [68] Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J,

- Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996; 380: 435-439.
- [69] Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996; 380: 439-442.
- [70] Miquerol L, Langille BL, Nagy A. Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. *Development* 2000; 127: 3941-3946.
- [71] Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J. Biol Chem.* 1998; 273: 13313-13316.
- [72] Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J. Biol Chem.* 1998; 273: 30336-30343.
- [73] Fujio Y, Walsh K. Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage-dependent manner. *J Biol Chem.* 1999; 274: 16349-16354.
- [74] Tran J, Master Z, Yu JL, Rak J, Dumont DJ, Kerbel RS. A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2002; 99: 4349-4354.
- [75] Dor Y, Porat R, Keshet E. Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 2001; 280: C1367-C1374.
- [76] Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr. Rev.* 2004; 25: 581-611.
- [77] Ben Av P, Crofford LJ, Wilder RL, Hla T. Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Lett.* 1995; 372: 83-87.
- [78] Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 736-741.
- [79] Soh EY, Sobhi SA, Wong MG, Meng YG, Siperstein AE, Clark OH, Duh QY. Thyroid-stimulating hormone promotes the secretion of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cell lines. *Surgery* 1996; 120: 944-947.



- [80] Shifren JL, Mesiano S, Taylor RN, Ferrara N, Jaffe RB. Corticotropin regulates vascular endothelial growth factor expression in human fetal adrenal cortical cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 1998; 83: 1342-1347.
- [81] Christenson LK, Stouffer RL. Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin stimulation of vascular endothelial growth factor production by macaque granulosa cells from pre- and periovulatory follicles. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 1997; 82: 2135-2142.
- [82] Stewart RJ, Panigrahy D, Flynn E, Folkman J. Vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis are regulated by androgens in hormone responsive human prostate carcinoma: evidence for androgen dependent destabilization of vascular endothelial growth factor transcripts. *J. Urol.* 2001; 165: 688-693.
- [83] Mueller MD, Vigne JL, Pritts EA, Chao V, Dreher E, Taylor RN. Progestins activate vascular endothelial growth factor gene transcription in endometrial adenocarcinoma cells. *Fertil. Steril.* 2003; 79: 386-392.
- [84] Mueller MD, Vigne JL, Minchenko A, Lebovic DI, Leitman DC, Taylor RN. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors alpha and beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2000; 97: 10972-10977.
- [85] Karkkainen MJ, Makinen T, Alitalo K. Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. *Nat. Cell Biol.* 2002; 4: E2-E5.
- [86] Geva E, Jaffe RB. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. *Fertil. Steril.* 2000; 74: 429-438.
- [87] Gerber HP, Condorelli F, Park J, Ferrara N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 23659-23667.
- [88] Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1993; 90: 10705-10709.
- [89] Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 25646-25654.
- [90] Maru Y, Yamaguchi S, Shibuya M. Flt-1, a receptor for vascular endothelial growth factor, has transforming and morphogenic potentials. *Oncogene* 1998; 16: 2585-2595.

- [91] Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, Kroll J, Plaisance S, De Mol M, Bono F, Kliche S, Fellbrich G, Ballmer-Hofer K, Maglione D, Mayr-Beyrle U, Dewerchin M, Dombrowski S, Stanimirovic D, Van Hummelen P, Dehio C, Hicklin DJ, Persico G, Herbert JM, Communi D, Shibuya M, Collen D, Conway EM, Carmeliet P. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat. Med.* 2003; 9: 936-943.
- [92] Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* 2003; 9: 669-676.
- [93] 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.
- [94] 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: 1904-1909.
- [95] Gale NW, Yancopoulos GD. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev.* 1999; 13: 1055-1066.
- [96] Brindle NP, Saharinen P, Alitalo K. Signaling and functions of angiopoietin-1 in vascular protection. *Circ. Res.* 2006; 98: 1014-1023.
- [97] Augustin HG, Koh GY, Thurston G, Alitalo K. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009; 10: 165-177.
- [98] Suri C, McClain J, Thurston G, McDonald DM, Zhou H, Oldmixon EH, Sato TN, Yancopoulos GD. Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science* 1998; 282: 468-471.
- [99] Peters KG, Kontos CD, Lin PC, Wong AL, Rao P, Huang L, Dewhirst MW, Sankar S. Functional significance of Tie2 signaling in the adult vasculature. *Recent Prog. Horm. Res.* 2004; 59: 51-71.
- [100] Fukuhara S, Sako K, Noda K, Nagao K, Miura K, Mochizuki N. Tie2 is tied at the cell-cell contacts and to extracellular matrix by angiopoietin-1. *Exp. Mol. Med.* 2009; 41: 133-139.
- [101] Teichert-Kuliszewska K, Maisonpierre PC, Jones N, Campbell AI, Master Z, Bendeck MP, Alitalo K, Dumont DJ, Yancopoulos GD, Stewart DJ. Biological action of angiopoietin-2 in a fibrin matrix model of angiogenesis is associated with activation of Tie2. *Cardiovasc. Res.* 2001; 49: 659-670.

- [102] Tsigkos S, Koutsilieris M, Papapetropoulos A. Angiopoietins in angiogenesis and beyond. *Expert. Opin. Investig. Drugs* 2003; 12: 933-941.
- [103] Visconti RP, Richardson CD, Sato TN. Orchestration of angiogenesis and arteriovenous contribution by angiopoietins and vascular endothelial growth factor (VEGF). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2002; 99: 8219-8224.
- [104] Sato TN, Qin Y, Kozak CA, Audus KL. Tie-1 and tie-2 define another class of putative receptor tyrosine kinase genes expressed in early embryonic vascular system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1993; 90: 9355-9358.
- [105] Makinde T, Agrawal DK. Intra and extravascular transmembrane signalling of angiopoietin-1-Tie2 receptor in health and disease. *J. Cell Mol. Med.* 2008; 12: 810-828.
- [106] Marron MB, Hughes DP, Edge MD, Forder CL, Brindle NP. Evidence for heterotypic interaction between the receptor tyrosine kinases TIE-1 and TIE-2. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 39741-39746.
- [107] Wong AL, Haroon ZA, Werner S, Dewhirst MW, Greenberg CS, Peters KG. Tie2 expression and phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. *Circ. Res.* 1997; 81: 567-574.
- [108] Nakayama T, Hatachi G, Wen CY, Yoshizaki A, Yamazumi K, Niino D, Sekine I. Expression and significance of Tie-1 and Tie-2 receptors, and angiopoietins-1, 2 and 4 in colorectal adenocarcinoma: Immunohistochemical analysis and correlation with clinicopathological factors. *World J. Gastroenterol.* 2005; 11: 964-969.
- [109] Voskas D, Jones N, Van Slyke P, Sturk C, Chang W, Haninec A, Babichev YO, Tran J, Master Z, Chen S, Ward N, Cruz M, Jones J, Kerbel RS, Jothy S, Dagnino L, Arbiser J, Klement G, Dumont DJ. A cyclosporine-sensitive psoriasis-like disease produced in Tie2 transgenic mice. *Am. J. Pathol.* 2005; 166: 843-855.
- [110] Uchida T, Nakashima M, Hirota Y, Miyazaki Y, Tsukazaki T, Shindo H. Immunohistochemical localisation of protein tyrosine kinase receptors Tie-1 and Tie-2 in synovial tissue of rheumatoid arthritis: correlation with angiogenesis and synovial proliferation. *Ann. Rheum. Dis.* 2000; 59: 607-614.
- [111] Metheny-Barlow LJ, Tian S, Hayes AJ, Li LY. Direct chemotactic action of angiopoietin-1 on mesenchymal cells in the presence of VEGF. *Microvasc. Res.* 2004; 68: 221-230.
- [112] Kosacka J, Figiel M, Engele J, Hilbig H, Majewski M, Spanel-Borowski K. Angiopoietin-1 promotes neurite outgrowth from dorsal root ganglion cells positive for Tie-2 receptor. *Cell Tissue Res.* 2005; 320: 11-19.

- [113] Iurlaro M, Scatena M, Zhu WH, Fogel E, Wieting SL, Nicosia RF. Rat aorta-derived mural precursor cells express the Tie2 receptor and respond directly to stimulation by angiopoietins. *J. Cell Sci.* 2003; 116: 3635-3643.
- [114] Brkovic A, Pelletier M, Girard D, Sirois MG. Angiopoietin chemotactic activities on neutrophils are regulated by PI-3K activation. *J. Leukoc. Biol.* 2007; 81: 1093-1101.
- [115] Feistritzer C, Mosheimer BA, Sturn DH, Bijuklic K, Patsch JR, Wiedermann CJ. Expression and function of the angiopoietin receptor Tie-2 in human eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004; 114: 1077-1084.
- [116] 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: 309-320.
- [117] Jones N, Chen SH, Sturk C, Master Z, Tran J, Kerbel RS, Dumont DJ. A unique autophosphorylation site on Tie2/Tek mediates Dok-R phosphotyrosine binding domain binding and function. *Mol. Cell Biol.* 2003; 23: 2658-2668.
- [118] Betsholtz C. Insight into the physiological functions of PDGF through genetic studies in mice. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004; 15: 215-228.
- [119] Fredriksson L, Li H, Eriksson U. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004; 15: 197-204.
- [120] Heldin CH, Ostman A, Ronnstrand L. Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1998; 1378: F79-113.
- [121] Rocha A, Azevedo I, Soares R. Anti-angiogenic effects of imatinib target smooth muscle cells but not endothelial cells. *Angiogenesis.* 2007; 10: 279-286.
- [122] Yao R, Cooper GM. Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* 1995; 267: 2003-2006.
- [123] Huang JS, Huang SS, Deuel TF. Transforming protein of simian sarcoma virus stimulates autocrine growth of SSV-transformed cells through PDGF cell-surface receptors. *Cell* 1984; 39: 79-87.
- [124] Yu J, Moon A, Kim HR. Both platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)-alpha and PDGFR-beta promote murine fibroblast cell migration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 282: 697-700.
- [125] Uren A, Yu JC, Gholami NS, Pierce JH, Heidaran MA. The alpha PDGFR tyrosine kinase mediates locomotion of two different cell types through chemotaxis and chemokinesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994; 204: 628-634.

- [126] Greenhalgh DG, Sprugel KH, Murray MJ, Ross R. PDGF and FGF stimulate wound healing in the genetically diabetic mouse. *Am. J. Pathol.* 1990; 136: 1235-1246.
- [127] Matei D, Kelich S, Cao L, Menning N, Emerson RE, Rao J, Jeng MH, Sledge GW. PDGF BB induces VEGF secretion in ovarian cancer. *Cancer Biol. Ther.* 2007; 6: 1951-1959.
- [128] Hellstrom M, Kalen M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development* 1999; 126: 3047-3055.
- [129] Gault CR, Obeid LM, Hannun YA. An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Adv. Exp. Med. Biol* 2010; 688: 1-23.
- [130] Gangoiti P, Camacho L, Arana L, Ouro A, Granado MH, Brizuela L, Casas J, Fabrias G, Abad JL, Delgado A, Gomez-Munoz A. Control of metabolism and signaling of simple bioactive sphingolipids: Implications in disease. *Prog. Lipid Res.* 2010; 49: 316-334.
- [131] Fyrst H, Saba JD. An update on sphingosine-1-phosphate and other sphingolipid mediators. *Nat. Chem. Biol* 2010; 6: 489-497.
- [132] Chalfant CE, Spiegel S. Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling. *J. Cell Sci.* 2005; 118: 4605-4612.
- [133] Yatomi Y, Ozaki Y, Ohmori T, Igarashi Y. Sphingosine 1-phosphate: synthesis and release. *Prostaglandins* 2001; 64: 107-122.
- [134] Nofer JR, Assmann G. Atheroprotective effects of high-density lipoprotein-associated lysosphingolipids. *Trends Cardiovasc. Med.* 2005; 15: 265-271.
- [135] Zhang B, Tomura H, Kuwabara A, Kimura T, Miura S, Noda K, Okajima F, Saku K. Correlation of high density lipoprotein (HDL)-associated sphingosine 1-phosphate with serum levels of HDL-cholesterol and apolipoproteins. *Atherosclerosis* 2005; 178: 199-205.
- [136] Yatomi Y, Ruan F, Hakomori S, Igarashi Y. Sphingosine-1-phosphate: a platelet-activating sphingolipid released from agonist-stimulated human platelets. *Blood* 1995; 86: 193-202.
- [137] English D, Welch Z, Kovalala AT, Harvey K, Volpert OV, Brindley DN, Garcia JG. Sphingosine 1-phosphate released from platelets during clotting accounts for the potent endothelial cell chemotactic activity of blood serum and provides a novel link between hemostasis and angiogenesis. *FASEB J.* 2000; 14: 2255-2265.

- [138] Hanel P, Andreani P, Graler MH. Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood. *FASEB J.* 2007; 21: 1202-1209.
- [139] Ito K, Anada Y, Tani M, Ikeda M, Sano T, Kihara A, Igarashi Y. Lack of sphingosine 1-phosphate-degrading enzymes in erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 357: 212-217.
- [140] Yatomi Y. Plasma sphingosine 1-phosphate metabolism and analysis. *Biochim. Biophys. Acta* 2008; 1780: 606-611.
- [141] Spiegel S, Milstien S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003; 4: 397-407.
- [142] Tabasinezhad M, Samadi N, Ghanbari P, Mohseni M, Saei AA, Sharifi S, Saeedi N, Pourhassan A. Sphingosin 1-phosphate contributes in tumor progression. *J. Cancer Res. Ther.* 2013; 9: 556-563.
- [143] Sanchez T, Estrada-Hernandez T, Paik JH, Wu MT, Venkataraman K, Brinkmann V, Claffey K, Hla T. Phosphorylation and action of the immunomodulator FTY720 inhibits vascular endothelial cell growth factor-induced vascular permeability. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 47281-47290.
- [144] Paik JH, Skoura A, Chae SS, Cowan AE, Han DK, Proia RL, Hla T. Sphingosine 1-phosphate receptor regulation of N-cadherin mediates vascular stabilization. *Genes Dev.* 2004; 18: 2392-2403.
- [145] Luo Y, Radice GL. N-cadherin acts upstream of VE-cadherin in controlling vascular morphogenesis. *J. Cell Biol.* 2005; 169: 29-34.
- [146] Gaengel K, Niaudet C, Hagikura K, Lavina B, Muhl L, Hofmann JJ, Ebarasi L, Nystrom S, Rymo S, Chen LL, Pang MF, Jin Y, Raschperger E, Roswall P, Schulte D, Benedito R, Larsson J, Hellstrom M, Fuxe J, Uhlen P, Adams R, Jakobsson L, Majumdar A, Vestweber D, Uv A, Betsholtz C. The sphingosine-1-phosphate receptor S1PR1 restricts sprouting angiogenesis by regulating the interplay between VE-cadherin and VEGFR2. *Dev. Cell* 2012; 23: 587-599.
- [147] Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ. Res.* 2005; 97: 512-523.
- [148] Simpson ER, Rochelle DB, Carr BR, MacDonald PC. Plasma lipoproteins in follicular fluid of human ovaries. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 1980; 51: 1469-1471.
- [149] Nofer JR, van der GM, Tolle M, Wolinska I, von Wnuck LK, Baba HA, Tietge UJ, Godecke A, Ishii I, Kleuser B, Schafers M, Fobker M, Zidek W, Assmann G, Chun J, Levkau B. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J. Clin. Invest* 2004; 113: 569-581.

- [150] Nofer JR, Fobker M, Hobbel G, Voss R, Wolinska I, Tepel M, Zidek W, Junker R, Seedorf U, von Eckardstein A, Assmann G, Walter M. Activation of phosphatidylinositol-specific phospholipase C by HDL-associated lysosphingolipid. Involvement in mitogenesis but not in cholesterol efflux. *Biochemistry* 2000; 39: 15199-15207.
- [151] Murata N, Sato K, Kon J, Tomura H, Yanagita M, Kuwabara A, Ui M, Okajima F. Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions. *Biochem. J.* 2000; 352 Pt 3: 809-815.
- [152] von Otte S, Paletta JR, Becker S, Konig S, Fobker M, Greb RR, Kiesel L, Assmann G, Diedrich K, Nofer JR. Follicular fluid high density lipoprotein-associated sphingosine 1-phosphate is a novel mediator of ovarian angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 2006; 281: 5398-5405.
- [153] Becker S, von Otte S, Robenek H, Diedrich K, Nofer JR. Follicular fluid high-density lipoprotein-associated sphingosine 1-phosphate (S1P) promotes human granulosa lutein cell migration via S1P receptor type 3 and small G-protein RAC1. *Biol. Reprod.* 2011; 84: 604-612.
- [154] Kimura T, Sato K, Malchinkhuu E, Tomura H, Tamama K, Kuwabara A, Murakami M, Okajima F. High-density lipoprotein stimulates endothelial cell migration and survival through sphingosine 1-phosphate and its receptors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003; 23: 1283-1288.
- [155] Miura S, Tanigawa H, Matsuo Y, Fujino M, Kawamura A, Saku K. Ras/Raf1-dependent signal in sphingosine-1-phosphate-induced tube formation in human coronary artery endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 306: 924-929.
- [156] Albert C, Garrido N, Mercader A, Rao CV, Remohi J, Simon C, Pellicer A. The role of endothelial cells in the pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome. *Mol. Hum. Reprod.* 2002; 8: 409-418.
- [157] 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.
- [158] Nap AW, Dunselman GA, de Goeij AF, Evers JL, Groothuis PG. Inhibiting MMP activity prevents the development of endometriosis in the chicken chorioallantoic membrane model. *Hum. Reprod.* 2004; 19: 2180-2187.
- [159] Kunzi-Rapp K, Ruck A, Kaufmann R. Characterization of the chick chorioallantoic membrane model as a short-term in vivo system for human skin. *Arch. Dermatol. Res.* 1999; 291: 290-295.
- [160] Katoh M, Nakada K, Miyazaki JI. Liver regeneration on chicken chorioallantoic membrane. *Cells Tissues. Organs* 2001; 169: 125-133.

- [161] Valdes TI, Kreutzer D, Moussy F. The chick chorioallantoic membrane as a novel in vivo model for the testing of biomaterials. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002; 62: 273-282.
- [162] Brooks PC, Montgomery AM, Cheresch DA. Use of the 10-day-old chick embryo model for studying angiogenesis. *Methods Mol. Biol.* 1999; 129: 257-269.
- [163] Isachenko V, Mallmann P, Petrunkina AM, Rahimi G, Nawroth F, Hancke K, Felberbaum R, Genze F, Damjanoski I, Isachenko E. Comparison of in vitro- and chorioallantoic membrane (CAM)-culture systems for cryopreserved medulla-contained human ovarian tissue. *PLoS. One.* 2012; 7: e32549.
- [164] Fraser HM. Regulation of the ovarian follicular vasculature. *Reprod. Biol Endocrinol.* 2006; 4: 18.
- [165] Tamanini C, De Ambrogi M. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reprod. Domest. Anim* 2004; 39: 206-216.
- [166] 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: 858-864.
- [167] 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: 2896-2905.
- [168] Shimizu T, Jiang JY, Iijima K, Miyabayashi K, Ogawa Y, Sasada H, Sato E. Induction of follicular development by direct single injection of vascular endothelial growth factor gene fragments into the ovary of miniature gilts. *Biol Reprod.* 2003; 69: 1388-1393.
- [169] Hayashi KG, Berisha B, Matsui M, Schams D, Miyamoto A. Expression of mRNA for the angiopoietin-tie system in granulosa cells during follicular development in cows. *J. Reprod. Dev.* 2004; 50: 477-480.
- [170] Li X, Ponten A, Aase K, Karlsson L, Abramsson A, Uutela M, Backstrom G, Hellstrom M, Bostrom H, Li H, Soriano P, Betsholtz C, Heldin CH, Alitalo K, Ostman A, Eriksson U. PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor. *Nat. Cell Biol.* 2000; 2: 302-309.
- [171] Slier LS, Taylor CC. Cell-type localization of platelet-derived growth factors and receptors in the postnatal rat ovary and follicle. *Biol. Reprod.* 2007; 76: 379-390.
- [172] Yoon SJ, Kim KH, Chung HM, Choi DH, Lee WS, Cha KY, Lee KA. Gene expression profiling of early follicular development in primordial, primary, and secondary follicles. *Fertil. Steril.* 2006; 85: 193-203.



- [173] Duleba AJ, Spaczynski RZ, Arici A, Carbone R, Behrman HR. Proliferation and differentiation of rat theca-interstitial cells: comparison of effects induced by platelet-derived growth factor and insulin-like growth factor-I. *Biol. Reprod.* 1999; 60: 546-550.
- [174] May JV, Bridge AJ, Gotcher ED, Gangrade BK. The regulation of porcine theca cell proliferation in vitro: synergistic actions of epidermal growth factor and platelet-derived growth factor. *Endocrinology* 1992; 131: 689-697.
- [175] Taylor CC. Platelet-derived growth factor activates porcine thecal cell phosphatidylinositol-3-kinase-Akt/PKB and ras-extracellular signal-regulated kinase-1/2 kinase signaling pathways via the platelet-derived growth factor-beta receptor. *Endocrinology* 2000; 141: 1545-1553.
- [176] Slier LS, Taylor CC. Platelet-derived growth factors and receptors in the rat corpus luteum: localization and identification of an effect on luteogenesis. *Biol. Reprod.* 2007; 76: 391-400.
- [177] Morita Y, Perez GI, Paris F, Miranda SR, Ehleiter D, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Xie Z, Reed JC, Schuchman EH, Kolesnick RN, Tilly JL. Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nat. Med.* 2000; 6: 1109-1114.
- [178] Tilly JL, Kolesnick RN. Sphingolipids, apoptosis, cancer treatments and the ovary: investigating a crime against female fertility. *Biochim. Biophys. Acta* 2002; 1585: 135-138.
- [179] Hernandez F, Peluffo MC, Bas D, Stouffer RL, Tesone M. Local effects of the sphingosine 1-phosphate on prostaglandin F2alpha-induced luteolysis in the pregnant rat. *Mol. Reprod. Dev.* 2009.
- [180] Ferrara N, Frantz G, LeCouter J, Dillard-Telm L, Pham T, Draksharapu A, Giordano T, Peale F. Differential expression of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries. *Am. J. Pathol.* 2003; 162: 1881-1893.
- [181] Ferrara N, Damico L, Shams N, Lowman H, Kim R. Development of ranibizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Retina* 2006; 26: 859-870.
- [182] Kohn EC. Angiogenesis in ovarian carcinoma: a formidable biomarker. *Cancer* 1997; 80: 2219-2221.
- [183] 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: 482-489.

- [184] 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: 287-293.
- [185] Delvigne A, Rozenberg S. Epidemiology and prevention of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): a review. *Hum. Reprod Update.* 2002; 8: 559-577.
- [186] Delvigne A, Rozenberg S. Review of clinical course and treatment of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). *Hum. Reprod. Update.* 2003; 9: 77-96.
- [187] Golan A, Ron-El R, Herman A, Soffer Y, Weinraub Z, Caspi E. Ovarian hyperstimulation syndrome: an update review. *Obstet. Gynecol. Surv.* 1989; 44: 430-440.
- [188] Bergh PA, Navot D. Ovarian hyperstimulation syndrome: a review of pathophysiology. *J. Assist. Reprod. Genet.* 1992; 9: 429-438.
- [189] Yamamoto S, Konishi I, Mandai M, Kuroda H, Komatsu T, Nanbu K, Sakahara H, Mori T. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in epithelial ovarian neoplasms: correlation with clinicopathology and patient survival, and analysis of serum VEGF levels. *Br. J. Cancer* 1997; 76: 1221-1227.
- [190] 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: 3300-3308.
- [191] 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: 261-265.
- [192] 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: 243-247.
- [193] Levin ER, Rosen GF, Cassidenti DL, Yee B, Meldrum D, Wisot A, Pedram A. Role of vascular endothelial cell growth factor in Ovarian Hyperstimulation Syndrome. *J. Clin. Invest* 1998; 102: 1978-1985.
- [194] Soares SR, Gomez R, Simon C, Garcia-Velasco JA, Pellicer A. Targeting the vascular endothelial growth factor system to prevent ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum. Reprod. Update.* 2008; 14: 321-333.

- [195] Rizk B, Aboulghar M, Smitz J, Ron-El R. The role of vascular endothelial growth factor and interleukins in the pathogenesis of severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum. Reprod. Update.* 1997; 3: 255-266.
- [196] Bachmakova NV, Dubrovina OS, Lisovskaya TV, Melkozerova OA, Maysina EN, Sentiurina LB. The development of ovarian hyperstimulation syndrome in the implementation of assisted reproductive technology in women with a background of endocrine pathology. *Gynecol. Endocrinol.* 2014; 30 Suppl 1: 25-29.
- [197] Manno M, Tomei F. Renin-angiotensin system activation during severe OHSS: cause or effect? *Fertil. Steril.* 2008; 89: 488.
- [198] Ozden S, Gurbuz B, Yalti S, Ergul B, Ozturkmen M. Ovarian hyperstimulation associated with a spontaneous pregnancy. *J. Obstet. Gynaecol.* 2005; 25: 394-395.
- [199] Montanelli L, Delbaere A, Di Carlo C, Nappi C, Smits G, Vassart G, Costagliola S. A mutation in the follicle-stimulating hormone receptor as a cause of familial spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 2004; 89: 1255-1258.
- [200] Scotti L, Irusta G, Abramovich D, Tesone M, Parborell F. Administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist affects corpus luteum vascular stability and development and induces luteal apoptosis in a rat model of ovarian hyperstimulation syndrome. *Mol. Cell Endocrinol.* 2011; 335: 116-125.
- [201] Agrawal R, Sladkevicius P, Engmann L, Conway GS, Payne NN, Bekis J, Tan SL, Campbell S, Jacobs HS. Serum vascular endothelial growth factor concentrations and ovarian stromal blood flow are increased in women with polycystic ovaries. *Hum. Reprod.* 1998; 13: 651-655.
- [202] Zaidi J, Campbell S, Pittrof R, Kyei-Mensah A, Shaker A, Jacobs HS, Tan SL. Ovarian stromal blood flow in women with polycystic ovaries--a possible new marker for diagnosis? *Hum. Reprod.* 1995; 10: 1992-1996.
- [203] Pattinson HA, Hignett M, Dunphy BC, Fleetham JA. Outcome of thaw embryo transfer after cryopreservation of all embryos in patients at risk of ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil. Steril.* 1994; 62: 1192-1196.
- [204] Shaker AG, Zosmer A, Dean N, Bekir JS, Jacobs HS, Tan SL. Comparison of intravenous albumin and transfer of fresh embryos with cryopreservation of all embryos for subsequent transfer in prevention of ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil. Steril.* 1996; 65: 992-996.
- [205] Ferraretti AP, Gianaroli L, Magli C, Fortini D, Selman HA, Feliciani E. Elective cryopreservation of all pronucleate embryos in women at risk of ovarian hyperstimulation syndrome: efficiency and safety. *Hum. Reprod.* 1999; 14: 1457-1460.

- [206] Al Shawaf T, Grudzinskas JG. Prevention and treatment of ovarian hyperstimulation syndrome. *Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 2003; 17: 249-261.
- [207] Lewit N, Kol S, Ronen N, Itskovitz-Eldor J. Does intravenous administration of human albumin prevent severe ovarian hyperstimulation syndrome? *Fertil. Steril.* 1996; 66: 654-656.
- [208] Mukherjee T, Copperman AB, Sandler B, Bustillo M, Grunfeld L. Severe ovarian hyperstimulation despite prophylactic albumin at the time of oocyte retrieval for in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil. Steril.* 1995; 64: 641-643.
- [209] Ng E, Leader A, Claman P, Domingo M, Spence JE. Intravenous albumin does not prevent the development of severe ovarian hyperstimulation syndrome in an in-vitro fertilization programme. *Hum. Reprod.* 1995; 10: 807-810.
- [210] Ndukwe G, Thornton S, Fishel S, Dowell K, Aloum M. Severe ovarian hyperstimulation syndrome: is it really preventable by prophylactic intravenous albumin? *Fertil. Steril.* 1997; 68: 851-854.
- [211] 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: 1164-1169.
- [212] Murakami M, Ito H, Hagiwara K, Kobayashi M, Hoshikawa A, Takagi A, Kojima T, Tamiya-Koizumi K, Sobue S, Ichihara M, Suzuki M, Banno Y, Nozawa Y, Murate T. Sphingosine kinase 1/S1P pathway involvement in the GDNF-induced GAP43 transcription. *J. Cell Biochem.* 2011; 112: 3449-3458.
- [213] Gaengel K, Genove G, Armulik A, Betsholtz C. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2009; 29: 630-638.
- [214] Allende ML, Yamashita T, Proia RL. G-protein-coupled receptor S1P1 acts within endothelial cells to regulate vascular maturation. *Blood* 2003; 102: 3665-3667.
- [215] 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: 4339-4348.
- [216] Ujioka T, Matsuura K, Kawano T, Okamura H. Role of progesterone in capillary permeability in hyperstimulated rats. *Hum. Reprod.* 1997; 12: 1629-1634.
- [217] Kitajima Y, Endo T, Manase K, Nishikawa A, Shibuya M, Kudo R. Gonadotropin-releasing hormone agonist administration reduced vascular

endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors, and vascular permeability of the ovaries of hyperstimulated rats. *Fertil. Steril.* 2004; 81 Suppl 1: 842-849.

- [218] Ozcakir HT, Giray SG, Ozbilgin MK, Uyar Y, Lacin S, Caglar H. Immunohistochemical detection of transforming growth factor-alpha, epidermal growth factor, and vascular endothelial growth factor expression in hyperstimulated rat ovary. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2005; 84: 887-893.
- [219] Woodruff TK, D'Agostino J, Schwartz NB, Mayo KE. Dynamic changes in inhibin messenger RNAs in rat ovarian follicles during the reproductive cycle. *Science* 1988; 239: 1296-1299.
- [220] Andreu C, Parborell F, Vanzulli S, Chemes H, Tesone M. Regulation of follicular luteinization by a gonadotropin-releasing hormone agonist: relationship between steroidogenesis and apoptosis. *Mol. Reprod. Dev.* 1998; 51: 287-294.
- [221] Sadrkhanloo R, Hofeditz C, Erickson GF. Evidence for widespread atresia in the hypophysectomized estrogen-treated rat. *Endocrinology* 1987; 120: 146-155.
- [222] Kaya M, Gurses C, Kalayci R, Ekizoglu O, Ahishali B, Orhan N, Oku B, Arican N, Ustek D, Bilgic B, Elmas I, Kucuk M, Kemikler G. Morphological and functional changes of blood-brain barrier in kindled rats with cortical dysplasia. *Brain Res.* 2008; 1208: 181-191.
- [223] Augustin HG, Braun K, Telemenakis I, Modlich U, Kuhn W. Ovarian angiogenesis. Phenotypic characterization of endothelial cells in a physiological model of blood vessel growth and regression. *Am. J. Pathol.* 1995; 147: 339-351.
- [224] Cherry JA, Hou X, Rueda BR, Davis JS, Townson DH. Microvascular endothelial cells of the bovine corpus luteum: a comparative examination of the estrous cycle and pregnancy. *J. Reprod. Dev.* 2008; 54: 183-191.
- [225] 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: 1161-1169.
- [226] Fiedler U, Augustin HG. Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation. *Trends Immunol.* 2006; 27: 552-558.
- [227] Bai Y, Cui M, Meng Z, Shen L, He Q, Zhang X, Chen F, Xiao J. Ectopic expression of angiopoietin-1 promotes neuronal differentiation in neural progenitor cells through the Akt pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009; 378: 296-301.
- [228] Gruemmer R, Motejlek K, Berghaus D, Weich HA, Neulen J. Regulation of soluble vascular endothelial growth factor receptor (sFlt-1/sVEGFR-1)

expression and release in endothelial cells by human follicular fluid and granulosa cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2005; 3: 57.

- [229] Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1983; 80: 3734-3737.
- [230] Edgell CJ, Haizlip JE, Bagnell CR, Packenham JP, Harrison P, Wilbourn B, Madden VJ. Endothelium specific Weibel-Palade bodies in a continuous human cell line, EA.hy926. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 1990; 26: 1167-1172.
- [231] Emeis JJ, Edgell CJ. Fibrinolytic properties of a human endothelial hybrid cell line (Ea.hy 926). *Blood* 1988; 71: 1669-1675.
- [232] Thornhill MH, Li J, Haskard DO. Leucocyte endothelial cell adhesion: a study comparing human umbilical vein endothelial cells and the endothelial cell line EA-hy-926. *Scand. J. Immunol.* 1993; 38: 279-286.
- [233] Saijonmaa O, Nyman T, Hohenthal U, Fyhrquist F. Endothelin-1 is expressed and released by a human endothelial hybrid cell line (EA.hy 926). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991; 181: 529-536.
- [234] van Oost BA, Edgell CJ, Hay CW, MacGillivray RT. Isolation of a human von Willebrand factor cDNA from the hybrid endothelial cell line EA.hy926. *Biochem. Cell Biol.* 1986; 64: 699-705.
- [235] Suggs JE, Madden MC, Friedman M, Edgell CJ. Prostacyclin expression by a continuous human cell line derived from vascular endothelium. *Blood* 1986; 68: 825-829.
- [236] Lu ZJ, Ren YQ, Wang GP, Song Q, Li M, Jiang SS, Ning T, Guan YS, Yang JL, Luo F. Biological behaviors and proteomics analysis of hybrid cell line EAhy926 and its parent cell line A549. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2009; 28: 16.
- [237] Savani RC, Wang C, Yang B, Zhang S, Kinsella MG, Wight TN, Stern R, Nance DM, Turley EA. Migration of bovine aortic smooth muscle cells after wounding injury. The role of hyaluronan and RHAMM. *J. Clin. Invest* 1995; 95: 1158-1168.
- [238] Eiselein L, Wilson DW, Lame MW, Rutledge JC. Lipolysis products from triglyceride-rich lipoproteins increase endothelial permeability, perturb zonula occludens-1 and F-actin, and induce apoptosis. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 2007; 292: H2745-H2753.
- [239] Parsons-Wingarter P, Lwai B, Yang MC, Elliott KE, Milaninia A, Redlitz A, Clark JI, Sage EH. A novel assay of angiogenesis in the quail chorioallantoic membrane: stimulation by bFGF and inhibition by angiostatin according to fractal dimension and grid intersection. *Microvasc. Res.* 1998; 55: 201-214.

- [240] Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* 1994; 264: 569-571.
- [241] Clark RA, Tonnesen MG, Gailit J, Cheresh DA. Transient functional expression of alphaVbeta 3 on vascular cells during wound repair. *Am. J. Pathol.* 1996; 148: 1407-1421.
- [242] Hodivala-Dilke K. alphavbeta3 integrin and angiogenesis: a moody integrin in a changing environment. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2008; 20: 514-519.
- [243] Zheng J, Redmer DA, Reynolds LP. Vascular development and heparin-binding growth factors in the bovine corpus luteum at several stages of the estrous cycle. *Biol. Reprod.* 1993; 49: 1177-1189.
- [244] Lee MJ, Thangada S, Claffey KP, Ancellin N, Liu CH, Kluk M, Volpi M, Sha'afi RI, Hla T. Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell* 1999; 99: 301-312.
- [245] Lee H, Goetzl EJ, An S. Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate stimulate endothelial cell wound healing. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 2000; 278: C612-C618.
- [246] Bourquin F, Riezman H, Capitani G, Grutter MG. Structure and function of sphingosine-1-phosphate lyase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Structure.* 2010; 18: 1054-1065.
- [247] Berdyshev EV, Gorshkova I, Usatyuk P, Kalari S, Zhao Y, Pyne NJ, Pyne S, Sabbadini RA, Garcia JG, Natarajan V. Intracellular S1P generation is essential for S1P-induced motility of human lung endothelial cells: role of sphingosine kinase 1 and S1P lyase. *PLoS. One.* 2011; 6: e16571.
- [248] Usatyuk PV, He D, Bindokas V, Gorshkova IA, Berdyshev EV, Garcia JG, Natarajan V. Photolysis of caged sphingosine-1-phosphate induces barrier enhancement and intracellular activation of lung endothelial cell signaling pathways. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 2011; 300: L840-L850.
- [249] Lee OH, Kim YM, Lee YM, Moon EJ, Lee DJ, Kim JH, Kim KW, Kwon YG. Sphingosine 1-phosphate induces angiogenesis: its angiogenic action and signaling mechanism in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999; 264: 743-750.
- [250] Berndt S, Perrier dS, Blacher S, Pequeux C, Lorquet S, Munaut C, Applanat M, Herve MA, Lamande N, Corvol P, van den BF, Frankenne F, Poutanen M, Huhtaniemi I, Geenen V, Noel A, Foidart JM. Angiogenic activity of human chorionic gonadotropin through LH receptor activation on endothelial and epithelial cells of the endometrium. *FASEB J.* 2006; 20: 2630-2632.
- [251] Phillips HS, Hains J, Leung DW, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is expressed in rat corpus luteum. *Endocrinology* 1990; 127: 965-967.

- [252] Kitajima Y, Endo T, Nagasawa K, Manase K, Honnma H, Baba T, Hayashi T, Chiba H, Sawada N, Saito H. Hyperstimulation and a gonadotropin-releasing hormone agonist modulate ovarian vascular permeability by altering expression of the tight junction protein claudin-5. *Endocrinology* 2006; 147 (2): 694-699.
- [253] Navot D, Bergh PA, Laufer N. Ovarian hyperstimulation syndrome in novel reproductive technologies: prevention and treatment. *Fertil. Steril.* 1992; 58: 249-261.
- [254] Kitsou C, Kosmas I, Lazaros L, Hatzi E, Euaggelou A, Mynbaev O, Tournaye H, Prapas N, Prapas I, Zikopoulos K, Galani V, Georgiou I. Ovarian hyperstimulation syndrome inhibition by targeting VEGF, COX-2 and calcium pathways: a preclinical randomized study. *Gynecol. Endocrinol.* 2014; 30: 587-592.
- [255] 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: 434-441.
- [256] Pauli SA, Tang H, Wang J, Bohlen P, Posser R, Hartman T, Sauer MV, Kitajewski J, Zimmermann RC. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor 2 pathway is critical for blood vessel survival in corpora lutea of pregnancy in the rodent. *Endocrinology* 2005; 146: 1301-1311.
- [257] Reynolds LP, Grazul-Bilska AT, Redmer DA. Angiogenesis in the corpus luteum. *Endocrine.* 2000; 12: 1-9.
- [258] Fraser HM, Wilson H, Wulff C, Rudge JS, Wiegand SJ. Administration of vascular endothelial growth factor Trap during the 'post-angiogenic' period of the luteal phase causes rapid functional luteolysis and selective endothelial cell death in the marmoset. *Reproduction* 2006; 132: 589-600.
- [259] Sato Y, Kanno S, Oda N, Abe M, Ito M, Shitara K, Shibuya M. Properties of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in signal transduction. *Ann. N. Y Acad. Sci.* 2000; 902: 201-205.
- [260] Shen BQ, Lee DY, Gerber HP, Keyt BA, Ferrara N, Zioncheck TF. Homologous up-regulation of KDR/Flk-1 receptor expression by vascular endothelial growth factor in vitro. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 29979-29985.
- [261] Abramovich D, Irusta G, Parborell F, Tesone M. Intrabursal injection of vascular endothelial growth factor trap in eCG-treated prepubertal rats inhibits proliferation and increases apoptosis of follicular cells involving the PI3K/AKT signaling pathway. *Fertil. Steril.* 2010; 93: 1369-1377.
- [262] Banerjee S, Mehta S, Haque I, Sengupta K, Dhar K, Kambhampati S, Van Veldhuizen PJ, Banerjee SK. VEGF-A165 induces human aortic smooth muscle cell migration by activating neuropilin-1-VEGFR1-PI3K axis. *Biochemistry* 2008; 47: 3345-3351.



- [263] Walz A, Keck C, Weber H, Kissel C, Pietrowski D. Effects of luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin on corpus luteum cells in a spheroid cell culture system. *Mol. Reprod. Dev.* 2005; 72: 98-104.
- [264] Pedram A, Razandi M, Levin ER. Deciphering vascular endothelial cell growth factor/vascular permeability factor signaling to vascular permeability. Inhibition by atrial natriuretic peptide. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 44385-44398.
- [265] Lippoldt A, Liebner S, Andbjer B, Kalbacher H, Wolburg H, Haller H, Fuxe K. Organization of choroid plexus epithelial and endothelial cell tight junctions and regulation of claudin-1, -2 and -5 expression by protein kinase C. *Neuroreport* 2000; 11: 1427-1431.
- [266] Hirase T, Staddon JM, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Itoh M, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S, Rubin LL. Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J. Cell Sci.* 1997; 110 ( Pt 14): 1603-1613.
- [267] Antonetti DA, Barber AJ, Khin S, Lieth E, Tarbell JM, Gardner TW. Vascular permeability in experimental diabetes is associated with reduced endothelial occludin content: vascular endothelial growth factor decreases occludin in retinal endothelial cells. Penn State Retina Research Group. *Diabetes* 1998; 47: 1953-1959.
- [268] Rodewald M, Herr D, Duncan WC, Fraser HM, Hack G, Konrad R, Gagsteiger F, Kreienberg R, Wulff C. 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: 1191-1199.
- [269] Gharbiya M, Iannetti L, Parisi F, De Vico U, Mungo ML, Marenco M. Visual and anatomical outcomes of intravitreal aflibercept for treatment-resistant neovascular age-related macular degeneration. *Biomed. Res. Int.* 2014; 2014: 273754.
- [270] Chang AA, Li H, Broadhead GK, Hong T, Schlub TE, Wijeyakumar W, Zhu M. Intravitreal aflibercept for treatment-resistant neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2014; 121: 188-192.
- [271] Teng LS, Jin KT, He KF, Zhang J, Wang HH, Cao J. Clinical applications of VEGF-trap (aflibercept) in cancer treatment. *J. Chin Med. Assoc.* 2010; 73: 449-456.
- [272] Hansen TM, Moss AJ, Brindle NP. Vascular endothelial growth factor and angiopoietins in neurovascular regeneration and protection following stroke. *Curr. Neurovasc. Res.* 2008; 5: 236-245.
- [273] Reusch P, Barleon B, Weindel K, Martiny-Baron G, Godde A, Siemeister G, Marme D. Identification of a soluble form of the angiopoietin receptor TIE-2

- released from endothelial cells and present in human blood. *Angiogenesis*. 2001; 4: 123-131.
- [274] Molskness TA, Stouffer RL, Burry KA, Gorrill MJ, Lee DM, Patton PE. Circulating levels of total angiopoietin-2 and the soluble Tie-2 receptor in women during ovarian stimulation and early gestation. *Fertil. Steril.* 2006; 86: 1531-1533.
- [275] Krasnow JS, Berga SL, Guzick DS, Zeleznik AJ, Yeo KT. Vascular permeability factor and vascular endothelial growth factor in ovarian hyperstimulation syndrome: a preliminary report. *Fertil. Steril.* 1996; 65: 552-555.
- [276] Goede V, Schmidt T, Kimmina S, Kozian D, Augustin HG. Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. *Lab Invest* 1998; 78: 1385-1394.
- [277] Hazzard TM, Molskness TA, Chaffin CL, Stouffer RL. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietin regulation by gonadotrophin and steroids in macaque granulosa cells during the peri-ovulatory interval. *Mol. Hum. Reprod.* 1999; 5: 1115-1121.
- [278] Wulff C, Wilson H, Largue P, Duncan WC, Armstrong DG, Fraser HM. Angiogenesis in the human corpus luteum: localization and changes in angiopoietins, tie-2, and vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 2000; 85: 4302-4309.
- [279] Master Z, Jones N, Tran J, Jones J, Kerbel RS, Dumont DJ. Dok-R plays a pivotal role in angiopoietin-1-dependent cell migration through recruitment and activation of Pak. *EMBO J.* 2001; 20: 5919-5928.
- [280] Cascone I, Audero E, Giraudo E, Napione L, Maniero F, Philips MR, Collard JG, Serini G, Bussolino F. Tie-2-dependent activation of RhoA and Rac1 participates in endothelial cell motility triggered by angiopoietin-1. *Blood* 2003; 102: 2482-2490.
- [281] Abdel-Malak NA, Srikant CB, Kristof AS, Magder SA, Di Battista JA, Hussain SN. Angiopoietin-1 promotes endothelial cell proliferation and migration through AP-1-dependent autocrine production of interleukin-8. *Blood* 2008; 111: 4145-4154.
- [282] Scotti L, Abramovich D, Pascuali N, de Z, I, Oubina A, Kopcow L, Lange S, Owen G, Tesone M, Parborell F. Involvement of the ANGPTs/Tie-2 system in ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). *Mol. Cell Endocrinol.* 2013; 365: 223-230.
- [283] Malik AB, Lynch JJ, Cooper JA. Endothelial barrier function. *J. Invest Dermatol.* 1989; 93: 62S-67S.

- [284] Maruo N, Morita I, Shirao M, Murota S. IL-6 increases endothelial permeability in vitro. *Endocrinology* 1992; 131: 710-714.
- [285] Chen SU, Chou CH, Lin CW, Lee H, Wu JC, Lu HF, Chen CD, Yang YS. Signal mechanisms of vascular endothelial growth factor and interleukin-8 in ovarian hyperstimulation syndrome: dopamine targets their common pathways. *Hum. Reprod.* 2010; 25: 757-767.
- [286] Menager C, Vassy J, Doliger C, Legrand Y, Karniguian A. Subcellular localization of RhoA and ezrin at membrane ruffles of human endothelial cells: differential role of collagen and fibronectin. *Exp. Cell Res.* 1999; 249: 221-230.
- [287] Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 1996; 84: 359-369.
- [288] Wojciak-Stothard B, Potempa S, Eichholtz T, Ridley AJ. Rho and Rac but not Cdc42 regulate endothelial cell permeability. *J. Cell Sci.* 2001; 114: 1343-1355.
- [289] Lampugnani MG. Endothelial cell-to-cell junctions: adhesion and signaling in physiology and pathology. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012; 2.
- [290] Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, Furuse K, Sasaki H, Nakayama M, Matsui T, Tsukita S, Furuse M, Tsukita S. ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell* 2006; 126: 741-754.
- [291] Gavard J, Gutkind JS. VE-cadherin and claudin-5: it takes two to tango. *Nat. Cell Biol.* 2008; 10: 883-885.
- [292] Taddei A, Giampietro C, Conti A, Orsenigo F, Breviario F, Pirazzoli V, Potente M, Daly C, Dimmeler S, Dejana E. Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nat. Cell Biol.* 2008; 10: 923-934.
- [293] Bienz M, Clevers H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 2000; 103: 311-320.
- [294] Leng T, Miller JM, Bilbao KV, Palanker DV, Huie P, Blumenkranz MS. The chick chorioallantoic membrane as a model tissue for surgical retinal research and simulation. *Retina* 2004; 24: 427-434.
- [295] Van Blerkom J, Antczak M, Schrader R. The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. *Hum. Reprod.* 1997; 12: 1047-1055.
- [296] Manau D, Balasch J, Jimenez W, Fabregues F, Civico S, Casamitjana R, Creus M, Vanrell JA. Follicular fluid concentrations of adrenomedullin, vascular

endothelial growth factor and nitric oxide in IVF cycles: relationship to ovarian response. *Hum. Reprod.* 2000; 15: 1295-1299.

- [297] Hammadeh ME, Munz W, Meisinger M, Herrmann W, Georg T, Rosenbaum P, Schmidt W. [Effects of ovarian stimulation on serum concentrations of lipids and ketone bodies in patients undergoing IVF/ICSI treatment]. *Zentralbl. Gynakol.* 2004; 126: 67-72.
- [298] Singleton PA, Dudek SM, Chiang ET, Garcia JG. Regulation of sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cytoskeletal rearrangement and barrier enhancement by S1P1 receptor, PI3 kinase, Tiam1/Rac1, and alpha-actinin. *FASEB J.* 2005; 19: 1646-1656.
- [299] Garcia JG, Liu F, Verin AD, Birukova A, Dechert MA, Gerthoffer WT, Bamberg JR, English D. Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. *J. Clin. Invest* 2001; 108: 689-701.
- [300] McVerry BJ, Garcia JG. Endothelial cell barrier regulation by sphingosine 1-phosphate. *J. Cell Biochem.* 2004; 92: 1075-1085.
- [301] Dudek SM, Jacobson JR, Chiang ET, Birukov KG, Wang P, Zhan X, Garcia JG. Pulmonary endothelial cell barrier enhancement by sphingosine 1-phosphate: roles for cortactin and myosin light chain kinase. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 24692-24700.
- [302] Mehta D, Konstantoulaki M, Ahmmed GU, Malik AB. Sphingosine 1-phosphate-induced mobilization of intracellular Ca<sup>2+</sup> mediates rac activation and adherens junction assembly in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 17320-17328.
- [303] Komarova YA, Mehta D, Malik AB. Dual regulation of endothelial junctional permeability. *Sci. STKE.* 2007; 2007: re8.
- [304] Liu Y, Wada R, Yamashita T, Mi Y, Deng CX, Hobson JP, Rosenfeldt HM, Nava VE, Chae SS, Lee MJ, Liu CH, Hla T, Spiegel S, Proia RL. Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J. Clin. Invest* 2000; 106: 951-961.
- [305] Bradaric MJ, Barua A, Penumatsa K, Yi Y, Edassery SL, Sharma S, Abramowicz JS, Bahr JM, Luborsky JL. Sphingosine-1 phosphate receptor (S1p1), a critical receptor controlling human lymphocyte trafficking, is expressed in hen and human ovaries and ovarian tumors. *J. Ovarian. Res.* 2011; 4: 4.
- [306] Aguilar A, Saba JD. Truth and consequences of sphingosine-1-phosphate lyase. *Adv. Biol. Regul.* 2012; 52: 17-30.

- [307] Bandhuvula P, Honbo N, Wang GY, Jin ZQ, Fyrst H, Zhang M, Borowsky AD, Dillard L, Karliner JS, Saba JD. S1P lyase: a novel therapeutic target for ischemia-reperfusion injury of the heart. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 2011; 300: H1753-H1761.
- [308] Zhao Y, Gorshkova IA, Berdyshev E, He D, Fu P, Ma W, Su Y, Usatyuk PV, Pendyala S, Oskouian B, Saba JD, Garcia JG, Natarajan V. Protection of LPS-induced murine acute lung injury by sphingosine-1-phosphate lyase suppression. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2011; 45: 426-435.
- [309] Ling B, Chen L, Alcorn J, Ma B, Yang J. Sphingosine-1-phosphate: a potential therapeutic agent against human breast cancer. *Invest New Drugs* 2011; 29: 396-399.
- [310] Wang F, Van Brocklyn JR, Hobson JP, Movafagh S, Zukowska-Grojec Z, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine 1-phosphate stimulates cell migration through a G(i)-coupled cell surface receptor. Potential involvement in angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 35343-35350.
- [311] Okamoto H, Takuwa N, Yokomizo T, Sugimoto N, Sakurada S, Shigematsu H, Takuwa Y. Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, and cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3. *Mol. Cell Biol.* 2000; 20: 9247-9261.
- [312] Olivera A, Rosenfeldt HM, Bektas M, Wang F, Ishii I, Chun J, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine kinase type 1 induces G12/13-mediated stress fiber formation, yet promotes growth and survival independent of G protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 46452-46460.
- [313] Garcia JG, Schaphorst KL. Regulation of endothelial cell gap formation and paracellular permeability. *J. Investig. Med.* 1995; 43: 117-126.
- [314] Stevens T, Garcia JG, Shasby DM, Bhattacharya J, Malik AB. Mechanisms regulating endothelial cell barrier function. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 2000; 279: L419-L422.
- [315] Wang L, Dudek SM. Regulation of vascular permeability by sphingosine 1-phosphate. *Microvasc. Res.* 2009; 77: 39-45.
- [316] Potter MD, Barbero S, Cheresch DA. Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin prevents binding of p120- and beta-catenin and maintains the cellular mesenchymal state. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 31906-31912.
- [317] Wallez Y, Cand F, Cruzalegui F, Wernstedt C, Souchelnytskyi S, Vilgrain I, Huber P. Src kinase phosphorylates vascular endothelial-cadherin in response to vascular endothelial growth factor: identification of tyrosine 685 as the unique target site. *Oncogene* 2007; 26: 1067-1077.

- [318] Mukherjee S, Tessema M, Wandinger-Ness A. Vesicular trafficking of tyrosine kinase receptors and associated proteins in the regulation of signaling and vascular function. *Circ. Res.* 2006; 98: 743-756.
- [319] Gavard J, Gutkind JS. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat. Cell Biol.* 2006; 8: 1223-1234.
- [320] Lee JF, Zeng Q, Ozaki H, Wang L, Hand AR, Hla T, Wang E, Lee MJ. Dual roles of tight junction-associated protein, zonula occludens-1, in sphingosine 1-phosphate-mediated endothelial chemotaxis and barrier integrity. *J. Biol. Chem.* 2006; 281: 29190-29200.
- [321] Li Q, Chen B, Zeng C, Fan A, Yuan Y, Guo X, Huang X, Huang Q. Differential activation of receptors and signal pathways upon stimulation by different doses of sphingosine-1-phosphate in endothelial cells. *Exp. Physiol* 2015; 100: 95-107.
- [322] Mehling M, Johnson TA, Antel J, Kappos L, Bar-Or A. Clinical immunology of the sphingosine 1-phosphate receptor modulator fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Neurology* 2011; 76: S20-S27.
- [323] Budde K, Schutz M, Glander P, Peters H, Waiser J, Liefeldt L, Neumayer HH, Bohler T. FTY720 (fingolimod) in renal transplantation. *Clin. Transplant.* 2006; 20 Suppl 17: 17-24.