

Angiogénesis en los tumores epiteliales ováricos

A. Celorio y A. Armas*

Departamento de Obstetricia y Ginecología. Universidad Autónoma. Madrid. Servicio de Ginecología Oncológica.
*Hospital Universitario La Paz. Madrid. España.

SUMMARY

There are several methodologies for the study of tumoral angiogenesis, specially the microvessel density count (MVD), inmunohistochemical analysis of VEGF, VEGF molecular expression on tumours cells and measurement of VEGF levels in tumours fluids and serum levels. There are significatives differences on MVD, VEGF immunostaining and VEGF mRNA expression between benign and malignant epithelial ovarian neoplasms. In ovarian carcinoma, there can be found high VEGF serum and ascites levels (pg/ml), as well as several others angiogenic factors, comparing to controls.

MDV, VEGF expression or VEGF serum levels, are not correlatet with FIGO stages and histological subtypes of epithelial ovarian neoplasms. There is not a significant relation between MVD and histological grades, but G_3 tumours have higher percentages of VEGF expression and VEGF serum levels compared to G_1-G_2 tumours.

Most analyzed publications make several different MVD_s and compare them, which make the comparison of results very difficult. High MVD sometimes make for a worse disease-free and overall survival probability, specially if there is high VEGF expression or high VEGF serum levels because of them being prognostic factors in Cox regression multivariate analysis.

Today's antiangiogenic therapy is directed, in high angiogenic activity ovarian tumours, towards small cells in emigration and proliferation, so that they become more vulnerables to adjuvant therapies, although their clinical efficiency is still uncertain.

INTRODUCCIÓN

El proceso metastásico responsable del 90% de las muertes oncológicas es característico del fenotipo celular maligno, y representa un fenómeno complejo con múltiples pasos y numerosos mecanismos, algunos desconocidos, siendo la angiogénesis un eslabón de la cadena metastásica^{1,2}. Una célula con capacidad angiogénica desprendida del tumor primario es más fácil que desarrolle una metástasis clínica que la célula sin fenotipo angiogénico, susceptible de originar una micrometástasis latente (similares índices proliferación/apoptosis)³. Los estudios en animales confirmaron que el carcinoma ovárico metastatiza en las membranas peritoneales como diminutas siembras avasculares que permanecen con tamaño limitado hasta que no se produce su neovascularización⁴.

La «densidad de microvasos», expresión de la angiogénesis, se utiliza como indicador biológico del potencial metastásico en diversas neoplasias (pulmón, próstata, mama, estómago, testículo, melanoma, etc.)⁵; sin embargo, en ciertos tumores, su valor pronóstico es controvertido. En una publicación anterior se realizó el estudio de la angiogénesis en el cáncer de cérvix uterino⁶, comunicando que la alta densidad de microvasos tumorales, se acompaña de peores tasas de supervivencias. El objetivo de esta revisión es estudiar la angiogénesis en tumores epiteliales ováricos para tratar de conocer si tiene relación con los factores pronósticos y valorar su influencia en las tasas de supervivencias de pacientes portadoras de estas neoplasias ováricas. Por último, analizaremos los acontecimientos más destacados de la incipiente terapia antiangiogénica.

ASPECTOS DE LA ANGIOGÉNESIS

La angiogénesis, o formación de nuevos vasos desde las células endoteliales de capilares preexistentes,

es un proceso fisiológico que ocurre, de modo controlado, durante el ciclo genital femenino (regeneración cíclica endometrial y ovulación)⁷, embarazo, cicatrización de heridas o en ciertas enfermedades (endometriosis, retinopatía diabética, reacciones inmunes, psoriasis, artritis reumatoide, etc.).

Para que se produzca angiogénesis en el conglomerado celular, un grupo de clones deben adquirir fenotipo angiogénico, ocasionando «efecto perfusión» con entrada de oxígeno y nutrientes en la masa celular que, a su vez, desencadena un «efecto paracrino» con producción de sustancias angiogénicas desde la matriz extracelular y células endoteliales de los capilares que circundan la lesión^{8,9}. En una publicación anterior⁶ fueron comentados los mecanismos de formación de neovasos tumorales y también se refirió que, en condiciones normales, la angiogénesis se encuentra regulada por el equilibrio entre sustancias angiogénicas y antiangiogénicas¹⁰, dedicando a estas últimas atención especial al estudiar la terapia antianangiogénica.

Entre las sustancias angiogénicas, destaca el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), familia de cinco miembros (PIGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF_s) con diferentes isoformas (polipéptidos de 165, 206, 145, 189 y 121 aminoácidos) que aparentemente realizan idénticas actividades biológicas^{11,12}. La VEGF₁₂₁ no se liga a la heparina, y es secretada como proteína soluble, pero VEGF₁₆₅ es básica, se liga a la heparina, y aparece en tejidos normales y tumorales, produciéndose en menor cantidad que VEGF₁₂₁, mientras que VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆ presentan gran afinidad por la heparina al incorporarse a la matriz extracelular¹³. El VEGF actúa unido a tres receptores tirosincinasa (Flt-1, KDR y Flt-4, en la actualidad VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3)^{14,15} y se comporta como mitógeno de células endoteliales, estimula la secreción de sustancias proteolíticas que contribuyen a degradar la membrana basal⁸, además de incrementar (50.000 veces más que la histamina) la permeabilidad vascular por lo que también se conoce como factor de permeabilidad vascular (VEGF/VPF)^{16,17}, con destacada participación (fundamentalmente VEGF₁₆₅) en la génesis y acumulación de líquidos¹⁸.

La endotelina (ET-1) es producida por células endoteliales y musculares vasculares, a estímulo de la hipoxia, factores de crecimiento y citocinas inflamatorias, comportándose como un factor de crecimiento autocrino¹⁹. Requiere unirse a dos receptores: ET_AR, un potente mitógeno de células musculares vasculares, y ET_BR, que estimula la proliferación y migración de las células del endotelio vascular, así como la

producción de VEGF²⁰. El factor de crecimiento fibroblástico (b-FGF) es una proteína que funciona sinérgicamente con VEGF como factor mitógeno del endotelio²¹. Crickard et al²² demostraron la capacidad mitógena de b-FGF en tres líneas celulares de cáncer ovárico (A₉₀ y A_{121-p} de tumor primario y A_{121-a} de ascitis), detectando expresión de 7 proteínas b-FGF y 5 receptores. Empleando técnicas de bioensayo, Di Blasio et al²³ analizan extractos citoplásicos de 7 carcinomas ováricos, confirmando en todos los tumores la síntesis *in situ* de b-FGF (niveles entre 4 y 33 ng/ml). El factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF) se comporta como una citocina, homóloga a la timidina-fosforilasa que, al degradar productos de la timidina, estimula la quimiotaxis de las células endoteliales²⁴.

Los factores de crecimiento de transformación (TGF) realizan diversas actividades biológicas, incluyendo la diferenciación celular e interfieren la respuesta inmune de células-T y tumoral. El TGF- α fue estudiado, entre otros, por Stromberg et al²⁵ en 17 líneas celulares de carcinoma ovárico, existiendo en 16 secreción de TGF- α y crecimiento de 8 líneas con presencia de TGF- α exógeno. El TGF- β es una proteína multifuncional, producida por diferentes tipos celulares, incluidas plaquetas activadas y macrófagos, con tres isoformas β_1 , β_2 y β_3 ²⁶ que participan en la proliferación celular, supresión de la respuesta inmune y formación de la matriz extracelular (acción sobre diversas proteasas). Hurteau et al²⁷ detectaron expresión TGF- β en 11 de 18 (61%) líneas celulares de cancer ovárico obtenidas de ascitis e inhibición de la incorporación de timidina-H³ a las células. El factor de necrosis tumoral (TNF) α y β es un factor angiogénico derivado de los macrófagos con amplia gama de actividades biológicas, en parte, dependientes de sus concentraciones²⁸.

DIAGNÓSTICO DE LA ANGIOGÉNESIS TUMORAL

Los tumores son heterogéneos en la distribución de microvasos y las áreas de alta neovascularización pueden aparecer en cualquier parte del tumor, aunque con mayor frecuencia se visualizan en la periferia tumoral. Realizados cortes de 3-6 μm en el bloque de parafina, una vez desparafinados, son teñidos con hematoxilina-eosina (H-E), siendo visualizada la preparación a poco aumento ($\times 10-40$) para localizar áreas de alta densidad (*hot spots*) de capilares arteriales y venosos. Seleccionada la preparación, se procede a realizar una técnica inmunohistoquímica peroxidasa estándar con diversos anticuerpos frente a antígenos

TABLA I. Valores de densidad de microvasos (MVD) en tumores epiteliales ováricos benignos y malignos

AUTORES	TÉCNICA RECUENTO		TUMORES BENIGNOS		TUMORES MALIGNOS	
	ANTICUERPOS	AUMENTOS	NÚMERO	MVD	NÚMERO	MVD
Hollingsworth et al ³⁷	CD34	200 400	– –	– –	43	55,2 ± 4,4 19,5 ± 1,5
Gasparini et al ³⁸	CD31	200	–	–	112	59,0 ± 25,5
Brustmann et al ³⁹	Factor VIII	400	14	14,0 ± 1,9	18	33,7 ± 3,4*
Abulafia et al ⁴⁰	Factor VIII	400	–	–	42	28,0 ± 2,8
Orre et al ⁴¹	Factor VIII	100	19	21,4 ± 3,7	20	28,9 ± 6,8
	CD31	100	–	20,4 ± 4,4	–	72,9 ± 10,3*
	CD34	100	–	36,0 ± 7,8	–	56,6 ± 8,5
Darai et al ⁴²	CD31	400	20	26,0 ± 3,6	20	87,0 ± 39*
Álvarez et al ⁴³	CD31	400	–	–	87	16,0
	Factor VII	400	–	–	–	15,0
Hata et al ⁴⁴	Factor VIII	200	–	–	38	31,0 ± 2,0
Terai et al ⁴⁵	CD34	200	–	–	54	74,5 ± 53
Shen et al ⁴⁶	Factor VIII	200	17	38,8 ± 17,8	64	37,6 ± 16
Salani et al ⁴⁷	CD31	200	–	–	48	38,4 ± 23,7

*p < 0,001.

específicos de células endoteliales (factor VIII, *Ulex europaeus*, CD34, CD31, CD36, etc.)²⁹⁻³³ y una vez conseguida la reacción inmunológica (antígenos-anticuerpos), la preparación se tiñe con una solución cromógena y se contratiñe con H-E para visualizar los microvasos.

Para el recuento de microvasos, similar al de mitosis/campo, que se realiza de forma manual o mejor mediante ordenador, se pueden seguir los criterios de Weidner³⁴, evaluando la media de microvasos en 3-5 campos, escogidos al azar, obteniendo la media de los campos examinados. La Organización Europea de Investigación y Tratamiento del Cáncer (Grupo Cooperativo del Cáncer Ginecológico) recomienda valorar la «media de densidad de microvasos» (MVD) en 10 campos elegidos al azar de áreas con alta vascularización, con la media de los valores superiores de recuento en cada campo³⁵, efectuada por dos observadores diferentes, con coeficiente de variación menor de 10%. Los controles se realizan en áreas del mismo tejido (estroma peritumoral, ovario normal, etc.). Para su empleo clínico es necesario unificar criterios, y se han realizado algunas propuestas basadas en el análisis crítico del estudio de la MVD³⁶.

En la tabla I se muestran diversos estudios que cuantifican la densidad de microvasos en tumores ováricos benignos (70 casos) y malignos (546 casos), con distintas técnicas y aumentos, lo que implica considerar diferentes áreas/campo. Sin embargo, aparecen diferencias de MVD entre tumores ováricos benignos y malignos, siendo significativas ($p < 0,001$) en tres^{39,41,42} de los cuatro estudios que la cuantifican en ambas variedades tumorales.

En la valoración de la angiogénesis tumoral, además de MVD, también se realizan técnicas inmunohistoquímicas, principalmente de VEGF, utilizando anticuerpos policlonales anti-VEGF en una técnica estreptoavidina-biotina-peroxidasa. Los resultados de la inmunotinción celular son negativos (–) (ausencia células positivas), débilmente positivos o moderados (+) (< 50% células teñidas) y fuertemente positivos o intensos (++) (≥ 50% células teñidas). El epitelio de cistoadenomas serosos es negativo o débilmente positivo, mientras que los quistes de cuerpo lúteo y endometriósicos son fuertemente positivos. Los tumores serosos *borderline* presentan inmunotinción en regiones de proyecciones papilares y penachos epiteliales, pero en la variedad mucinosa aparecen patrones focales, al ser negativo el epitelio mucosecretor adyacente al quiste y positivo el epitelio mucoso atípico. En los carcinomas ováricos, la tinción VEGF se localiza en el citoplasma celular, tanto en áreas sólidas como papilares, con inmunorreactividad variable las células de la estroma.

En la tabla II se resume la expresión VEGF con técnicas inmunohistoquímicas en tumores epiteliales ováricos benignos (78 casos) y malignos (378 casos), observando mayores porcentajes de expresión en tumores malignos, y de los cinco estudios que comparan los porcentajes entre ambas variedades tumorales, en cuatro^{50,51,54,55}, existen diferencias significativas ($p < 0,001$). Diversas investigaciones^{37,46,53,56} encuentran limitada relación entre MVD y expresión VEGF, sugiriendo que en los tumores ováricos el incremento de la expresión VEGF reflejaría mayor actividad proliferativa celular; por el contrario, dos estudios^{47,52} informan de que los tumores con alta MVD se asocian

TABLA II. Porcentajes de expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) con técnicas immunohistoquímicas en tumores epiteliales ováricos benignos y malignos

AUTORES	TUMORES BENIGNOS		TUMORES MALIGNOS	
	NÚMERO	(%)	NÚMERO	(%)
Boocock et al ⁴⁸	—	—	5	100
Abu-Jawdeh et al ⁴⁹	—	—	14	100
Emoto et al ⁵⁰	17	11,4	17	86,7*
Yamamoto et al ⁵¹	15	33,0	70	97,0*
Nakanishi et al ⁵²	—	—	60	78,3
Orre et al ⁵³	19	42,0	20	75,0
Garzetti et al ⁵⁴	10	5,0	32	36,5*
Paley et al ⁵⁵	—	—	48	41,6
Shen et al ⁴⁶	17	6,0	64	48,0*
Salani et al ⁴⁷	—	—	48	79,0

*p < 0,001.

TABLA III. Porcentajes de expresión ARNm-VEGF con técnicas moleculares en tumores epiteliales ováricos benignos y malignos

AUTORES	TUMORES BENIGNOS		TUMORES MALIGNOS	
	NÚMERO	(%)	NÚMERO	(%)
Reynolds et al ⁵⁹	7	14	11	100*
Broocock et al ⁴⁸	—	—	5	100
Abu-Jawdeh et al ⁴⁹	2	0	21	100
Sowter et al ⁶⁰	8	0	10	100
Paley et al ⁶¹	—	—	55	42
Hartenbach et al ⁵⁶	—	—	18	67
Orre et al ⁵³	13	38	14	57

*p < 0,001. VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular.

con intensa expresión inmunohistoquímica VEGF (p < 0,0001).

Junto con VEGF, se pueden analizar otros factores angiogénicos. Así, Henriksen et al⁵⁷ demostraron que la expresión TGF-β era mayor en células de carcinomas ováricos que en tumores benignos y ovarios normales. En el MD Anderson Cancer Center (Houston, Texas)⁵⁸ se evaluaron muestras de 3 ovarios normales, 10 tumores ováricos primarios y metástasis, observando que la expresión TGF fue mayor en tumores primarios y metastásicos, tanto para TGF-β₁ (p < 0,012) como de TGF-β₂ (p < 0,001), respecto a tejidos ováricos normales. Una reciente publicación italiana⁴⁷ estudió, en 48 tumores epiteliales ováricos malignos y 20 muestras adicionales de ascitis, la expresión de endotelina (ET-1) y sus receptores, con un 84% de expresión ET-1 y un 93% de ET_AR, y mayores porcentajes de este último receptor en tumores ET-1 positivos, siendo los porcentajes de expresión ET_BR similares en tumores ET-1 positivos y negati-

vos, además de existir mayor MVD en tumores ET-1 positivos (p < 0,01) y expresión VEGF (p < 0,001).

No son abundantes las investigaciones que emplean técnicas moleculares de ARNm-VEGF (PCR-RT transcripción inversa, hibridación *in situ*, etc.) para la valoración de la angiogénesis en tumores ováricos, según se observa en la tabla III, que incluye 30 tumores ováricos benignos y 134 tumores malignos, apreciando superiores porcentajes de expresión VEGF en variedades malignas. En la Universidad de Cambridge (Reino Unido)⁴⁸ se estudió la expresión VEGF, Flt-1 y KDR, en 5 carcinomas ováricos primarios y metástasis de 3 pacientes diferentes, encontrando expresión elevada ARNm-VEGF en células tumorales, especialmente en márgenes de todos los tumores primarios y metástasis. Abu-Jawdeh et al⁴⁹ analizan la expresión VEGF y sus receptores, mediante hibridación *in situ*, con porcentajes del 0 (4 ovarios normales), el 0 (4 tumores benignos), el 50 (8 tumores borderline) y el 100% (21 tumores malignos). Por el contrario, Orre et al⁵³ no observan diferencias significativas entre porcentajes de expresión VEGF del 38 (13 tumores benignos), el 28 (7 tumores borderline) y el 57% (14 tumores ováricos malignos). El Departamento de Obstetricia y Ginecología de Gifu (Japón)⁶³ investigó la expresión ARNm-VEGF en 20 ovarios normales y 128 carcinomas ováricos, detectándose VEGF₁₆₅ y VEGF₁₂₁ tanto en ovarios normales como en carcinomas, mientras que la expresión fue débil para VEGF₁₈₉ e indetectable VEGF₂₀₆. Un reciente estudio⁴⁶ con escaso material (un ovario normal, 2 tumores serosopapilares y 2 tumores ováricos malignos) informa de que en el tejido ovárico normal predominan las isoformas 121 y 165, mientras que en tumores fueron detectadas las cuatro isoformas de VEGF pero con el siguiente orden decreciente de intensidad: 121 → 165 → 189 → 206.

Respecto al análisis de otros factores angiogénicos, en una publicación inglesa⁵⁹ se encuentra mayor expresión ARNm-PD-ECGF en tumores ováricos malignos (17 casos) que en benignos (7 casos) (p < 0,001), con baja expresión en ovarios normales (4 casos). Un estudio cooperativo⁶⁴ comunicó que las expresiones ARNm para TGF-β₁, TGF-β₂ y TGF-β₃ fueron del 20, el 53 y el 60% (15 tumores benignos), el 71, el 57 y el 57 (7 tumores borderline) y el 46, el 66 y el 66% (74 tumores malignos), siendo mayores en tumores con receptores de estrógeno (p = 0,0012).

Existen investigaciones que cuantifican, por medio de técnicas de inmunoensayo, con diferentes kits, VEGF y otros factores angiogénicos en líquidos tumorales, suero y derrames líquidos (ascitis, pleurales, etc.). Yamamoto et al⁵¹ aportan diferencias de

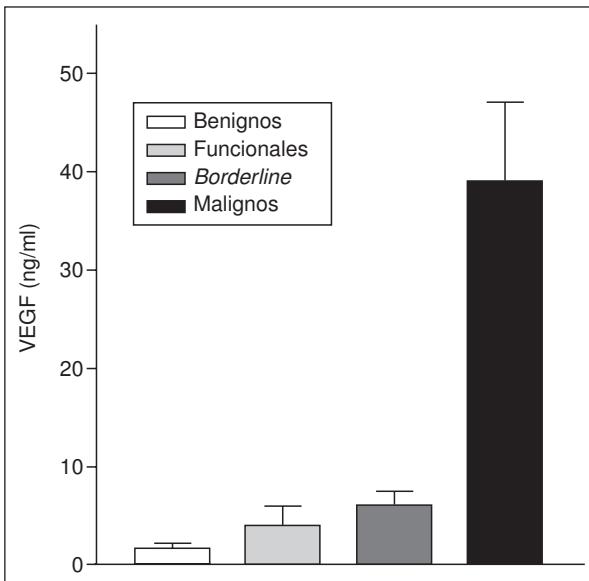


Fig. 1. Determinaciones del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (ELISA) en líquidos tumorales. Los tumores malignos contienen elevados valores comparados con tumores benignos ($p < 0,001$), tumores borderline ($p < 0,01$) y quistes funcionales ($p < 0,001$) (modificada⁶⁵).

VEGF en 5 líquidos de tumores ováricos benignos (1.662 ± 2.076 pg/ml), 4 tumores borderline (2.739 ± 1.192 pg/ml) y 8 carcinomas (10.908 ± 9.576 pg/ml) ($p < 0,05$). Igualmente, Hazelton et al⁶⁵ comunican que existen diferencias significativas de VEGF, entre líquidos de 29 tumores ováricos benignos ($1,6 \pm 0,4$ ng/ml), 8 quistes funcionales ($3,8 \pm 2,0$ ng/ml), 5 tumores borderline ($5,7 \pm 1,5$ ng/ml) y 13 tumores malignos ($38,5 \pm 8,2$ ng/ml) ($p < 0,001$), considerando que podrían ser de ayuda para identificar, mediante punción, los tumores ováricos benignos y malignos (fig. 1).

En la tabla IV aparecen diversos estudios que muestran elevados valores séricos de VEGF (pg/ml) en tumores ováricos malignos (194 casos) respecto a los controles. Una publicación inglesa⁶⁶ que incluye a 39 pacientes (estadios III y IV) comunica altos porcentajes de incremento de VEGF (61%), angiogenina (84,7%) y b-FGF (92,3%) ($p < 0,05$). Oehler y Caffier⁷¹ no aprecian diferencias significativas en valores séricos de VEGF entre mujeres sanas (20 casos) y tumores ováricos benignos (20 casos), pero sí entre estos dos grupos y los tumores malignos (41 casos), consiguiendo la valoración sérica de VEGF (punto de corte de 300 pg/ml), un 71% de sensibilidad y un 65% de especificidad en la diferenciación de tumores benignos frente a malignos. En Friburgo (Alemania)⁷⁰ se estudian, entre otros procesos, los valores séricos

TABLA IV. Valores séricos (pg/ml) de factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en tumores epiteliales ováricos malignos y controles

AUTORES	NÚMERO	VALORES	CONTROLES
Yamamoto et al ⁵¹	21	295 ± 237	90 ± 92
Barton et al ⁶⁶	39	1.167 ± 227	253 ± 110
Obermair et al ⁶⁷	44	380	219
Chen et al ⁶⁸	56	459	—
Santin et al ⁶⁹	6	408	46
Kraft et al ⁷⁰	28	1.022	376
Oehler y Caffier ⁷¹	41	508 ± 370	237 ± 138

de VEGF en 145 individuos sanos (media de 294 pg/ml), 129 cánceres de mama (media de 362 pg/ml), 48 cánceres gastrointestinales (media de 433 pg/ml) y 40 cánceres de ovario, con diferencias significativas entre enfermedad local y metastásica, y en estos últimos se detectan máximas concentraciones (media de 1.022 pg/ml) ($p < 0,001$) (fig. 2).

Los valores de VEGF en ascitis son más elevados que en suero. Los numerosos estudios experimentales, que no citamos, y clínicos, confirman la participación del VEGF en la formación de ascitis, al producir hiperpermeabilidad vascular y extravasación de proteínas plasmáticas (fibrinógeno), independiente de la densidad de microvasos tumorales. Barton et al⁶⁶ realizan determinaciones de VEGF, angiogenina y b-FGF en ascitis de 39 pacientes con carcinomas ováricos avanzados, apreciando valores elevados en 75,5% (VEGF), 60,6% (angiogenina) y 97,2% (b-FGF), mientras que Santin et al⁶⁹ obtienen en 6 ascitis valores medios de VEGF de 5.483 pg/ml. En un estudio⁷² se investigaron las concentraciones de VEGF en 25 ascitis no tumorales y tumorales, detectando valores de VEGF 45 veces superiores en cánceres ováricos (12 casos) que en cirrosis. Kraft et al⁷⁰ valoran los valores de VEGF en líquidos pleurales y/o peritoneales de 7 individuos con cirrosis (303 pg/ml) y 49 cánceres, con valores medios más elevados en cánceres ováricos (28 casos) (5.528 pg/ml) ($p < 0,001$) que en cánceres de mama (12 casos) (885 pg/ml) y cánceres gastrointestinales (9 casos) (813 pg/ml). Por último, Salani et al⁴⁷ evalúan 20 muestras de ascitis de carcinomas ováricos, encontrando en 17 (85%) valores de VEGF superiores a 10 pmol/l, así como altas concentraciones de endotelina (ET-1) (≥ 10 pmol/l).

RELACIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS CON LOS FACTORES PRONÓSTICOS

Son bastante contradictorias las investigaciones que relacionan la angiogénesis con los estadios (FIGO) de

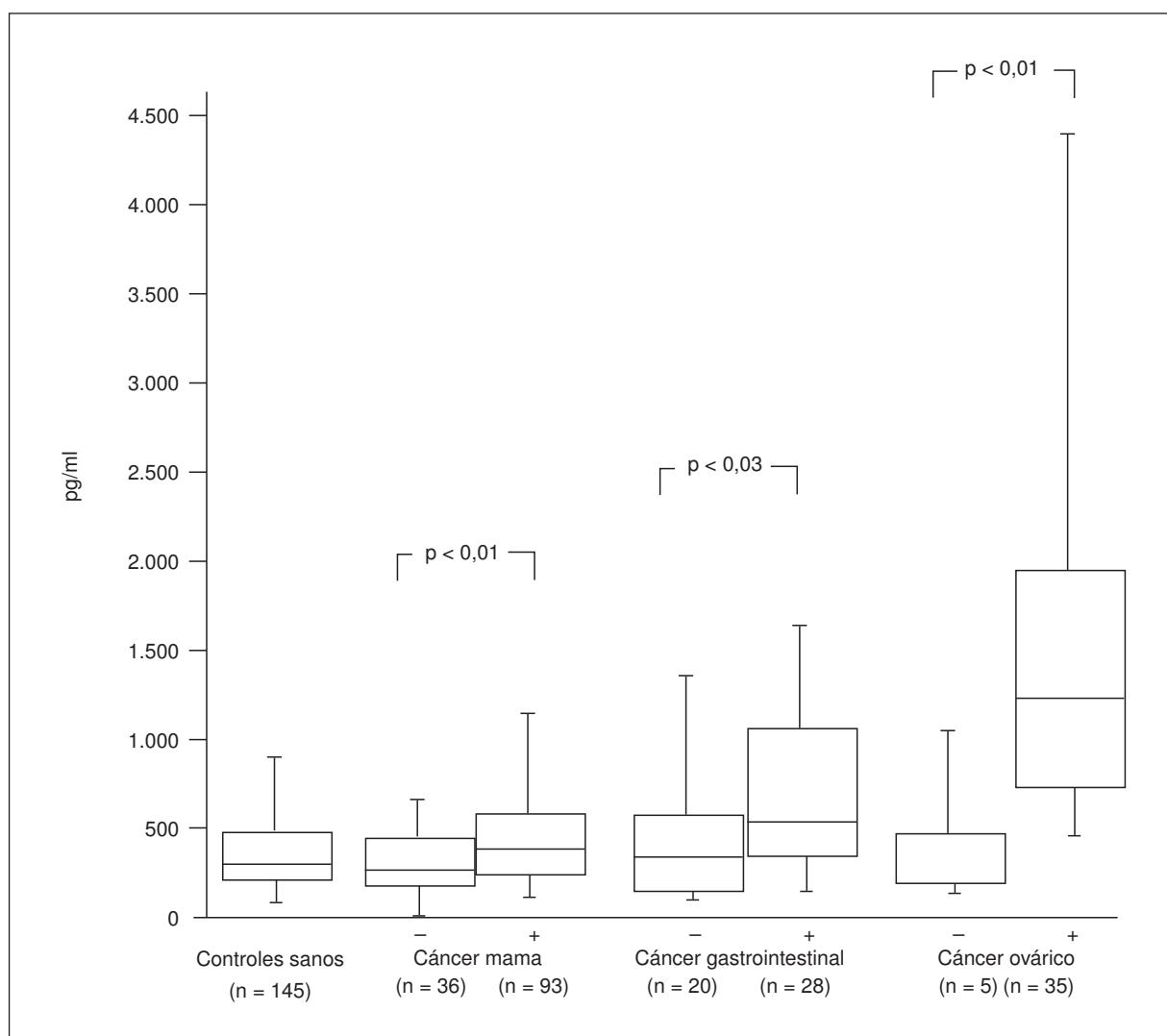


Fig. 2. Concentraciones séricas de factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en controles sanos y varios tipos de cánceres, con enfermedad local (-) y metastásica (+) (modificada)⁷⁰.

los tumores epiteliales ováricos malignos. Numerosos estudios^{40,43-46,50,52,73,74} no encuentran relación entre la MVD y estadios precoces o avanzados de la enfermedad ovárica. Según Terai et al⁴⁵ aparece correlación entre el volumen de metástasis peritoneales y MVD en el tumor primario ($p < 0,001$), sugiriendo que el tumor primario con alta proporción de células angiogénicas, occasionaría mayor tamaño de los implantes metastásicos. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre expresión ARNm-VEGF y tamaño tumor primario, estadios o volumen de ascitis⁶³, ni con inmunorreactividad VEGF⁵²; por el contrario, en

una reciente publicación japonesa⁴⁶ que incluye 64 tumores ováricos, existió relación significativa entre intensidad de inmunorreactividad VEGF y estadios I-II y III-IV ($p = 0,002$). No aparecen diferencias significativas entre valores séricos de VEGF, estadios, compromiso ganglionar o tumor residual^{68,75}, lo que indicaría que la producción de VEGF es continua durante la progresión de la enfermedad ovárica, aunque Kraft et al⁷⁰ detectan diferencias de valores séricos entre cánceres ováricos localizados (5 casos) y metastásicos (30 casos) ($p < 0,001$). Chopra et al⁷⁶ comunican que en estadios I existió incremento significativo de

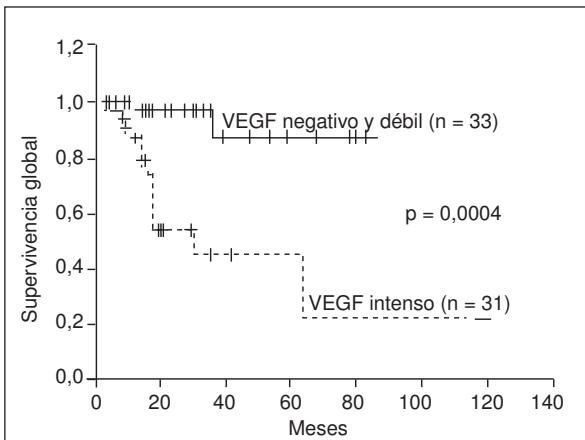


Fig. 3. Curvas de supervivencias globales en 64 pacientes con carcinoma ovárico agrupadas según expresión inmunohistoquímica del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)⁴⁶.

valores séricos de b-FGF e interleucinas 8 y 10; en estadios II, aparecieron mayores concentraciones de TNF- β e interleuquina 7, mientras que en estadios III-IV, se elevan el TNF- α e interleuquinas 2 y 6.

Cuando se analiza la angiogénesis en las variedades histológicas de tumores epiteliales ováricos, existen estudios^{40,44,46,50,74} que no aprecian existencia de relación significativa entre MVD y subtipos histológicos. Algunos autores^{38,41,52} comunican que se asocian mayores valores de MVD en variedades mucinosas ($p < 0,01$), siendo baja en variedades de células claras, hallazgos confirmados con valoración de la expresión inmunohistoquímica VEGF^{52,55}, aunque Yamamoto et al⁵¹ comunican que la inmunorreacción VEGF es superior en tumores de células claras que en otras variedades histológicas ($p < 0,05$). Considerando los valores séricos de VEGF, diversas publicaciones detectan ausencia de relaciones significativas con los tipos histológicos^{67,68,75}. En un estudio holandés⁷³ no existió relación entre MVD, volumen epitelio, índice actividad mitótica, área nuclear, así como con grados histológicos, hallazgos confirmados en otras investigaciones^{38,43,46,74}. Barton et al⁶⁶ comunican asociación de intensa reacción inmunohistoquímica VEGF y tumores G₃, mientras que Garzetti et al⁵⁴ observan porcentajes de expresión VEGF del 12% (17 casos G₁₋₂) y 45,3% (15 casos G₃) ($p < 0,001$), y Shen et al⁴⁶ aportan porcentajes del 34,7% (G_{1-G₂}) y el 83,3% (G₃) ($p = 0,0004$); por el contrario, Paley et al⁵⁵ no objetivan relación entre la inmunorreactividad de VEGF y los grados histológicos. En cuatro publicaciones^{67-69,75}, aparecen valores séricos de VEGF, significativamente menores en tumores G_{1-G₂} que en G₃.

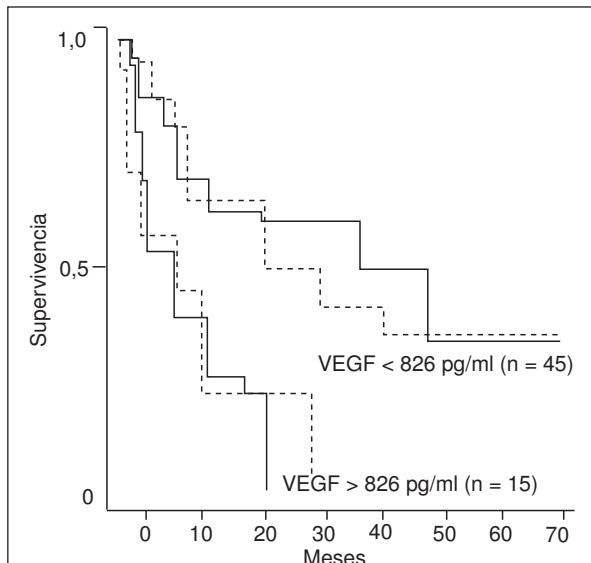


Fig. 4. Curvas de supervivencias (Kaplan-Meier) global (—) y libre-enfermedad (- -) en mujeres con cáncer de ovario, según valores séricos de factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) menores y mayores de 826 pg/ml (modificada)⁷⁵.

En los últimos años, se dedica especial atención a la angiogénesis tumoral ovárica y su importancia como factor pronóstico para tasas de supervivencias. Encontramos estudios^{45,46,52,73} que no aprecian relación significativa entre valores de MVD y tasas de supervivencias, aunque existen otros^{37,42,43,74} que, realizando variables dicotomizaciones de la media de microvasos tumorales ($\leq 10 > 10$; $\leq 40 > 40$; $\leq 80 > 80$), comunican presencia de relación significativa con tasas de supervivencias globales. Además de la valoración de la MVD, una investigación austriaca⁷⁸ cuantifica con análisis de imágenes computarizadas áreas (mm^2) de alta neovascularización, en 28 carcinomas ováricos avanzados (estadios IIIC), y entre las 14 mujeres que sobreviven 6 años o más, la media fue de $0,038 \pm 0,026$ y de $0,110 \pm 0,034 \text{ mm}^2$ en las 14 que fallecen por enfermedad ($p < 0,0001$). Un estudio preliminar español⁷⁹ informa de que 17 pacientes (58,6%) fallecidas por cáncer ovárico tenían un área endotelial media de $0,01 \pm 0,007 \text{ mm}^2$ y entre las supervivientes, $0,003 \pm 0,001 \text{ mm}^2$ ($p = 0,0001$).

Con excepción de una publicación⁵², observamos que aparece una relación significativa entre intensidad (negativa/débil y fuerte) de inmunorreactividad VEGF y tasas de supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad^{44,51,54} (fig. 3). Aunque un estudio alemán⁷⁷ no detectó relación entre expresión ARNm-VEGF y tasas de supervivencias, sin embargo, otros

TABLA V. Tumores epiteliales ováricos malignos. Análisis de multivariables para tasas de supervivencias que incluyen estudio de densidad de microvasos (MVD) y factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)

AUTORES	VARIABLES ESTUDIADAS	VARIABLES SIGNIFICATIVAS
Van Diest et al ⁷³	Edad. Estadios. Grado histológico. Porcentaje epitelio. Índice mitótico. Área nuclear. MVD. Ploidía ADN. Tamaño enfermedad poscirugía	Estadios. Área nuclear. Enfermedad residual poscirugía
Hollingsworth et al ³⁷	Estadios. Tipos y grados histológicos. MVD ($\times 200$, $\times 400$)	Estadios. MVD ($\times 400$)
Gasparini et al ³⁸	Edad. Condición física. Estadios. Tipos y grados histológicos. MVD. Enfermedad residual postoperatoria. Respuesta quimioterapia	Condición física. Tipo histológico. Enfermedad residual poscirugía
Yamamoto et al ⁵¹	Edad. Estadios. Tipo histológico. Inmunorreactividad VEGF. Volumen tumor residual	Estadios
Tempfer et al ⁷⁵	Estadios. Estatus ganglionar. Grado histológico. Valor sérico (826 pg/ml) de VEGF	Estadios. Estatus ganglionar. Valor sérico VEGF
Garzetti et al ⁵⁴	Estadios. Grado histológico. Inmunorreactividad VEGF. Enfermedad residual poscirugía	Inmunorreactividad VEGF. Enfermedad residual poscirugía
Chen et al ⁶⁸	Estadios. Tipos y grados histológicos. Valores séricos VEGF y CA-125. Tamaño enfermedad residual	Estadios. Grado histológico. Valor sérico VEGF
Álvarez et al ⁴³	Edad. Estadios. Grado histológico. MVD	Estadios. MVD
Shen et al ⁴⁶	Estadios. Grado histológico. MVD. Inmunorreactividad VEGF	Estadios. Inmunorreactividad VEGF

comunican que las mujeres cuyos tumores ováricos evidencian fuerte expresión ARNm-VEGF presentan peores tasas de supervivencias^{56,61}. Tempfer et al⁷⁵ informan de que existe relación significativa entre valores séricos preterapéuticos de VEGF (dicotomizados en < 826 y > 826 pg/ml) y tasas de supervivencia libre de enfermedad ($p = 0,003$) y global ($p = 0,007$) (fig. 4). En un estudio realizado en Taiwan⁶⁸ se comunica que los valores séricos elevados de VEGF, en 56 pacientes con cáncer ovárico, media de seguimiento 34 meses (rango, 9-78), se relacionaron de forma significativa con disminución de tasas de supervivencia global ($p < 0,001$) y supervivencia libre de enfermedad ($p = 0,001$). Fujimoto et al⁶³ notifican mayores tasas de supervivencias a los 24 meses, en pacientes con resección completa tumoral, y valores bajos de VEGF (< 900 pg/mg proteína) ($n = 30$ casos) que con valores de VEGF elevados (> 1.200 pg/mg proteína) ($n = 18$ casos) ($p < 0,01$). La tabla V evidencia nueve estudios de multivariantes (regresión múltiple de Cox)⁸⁰ de algunas de las publicaciones antes mencionadas donde se incluye estudio de la angiogénesis (solamente MVD, VEGF para no hacer extensa la tabla), encontrando en seis que la valoración de MVD y VEGF fueron variables significativas para tasas de supervivencias en mujeres con tumores epiteliales ováricos malignos.

Existen investigaciones que relacionan las tasas de supervivencias de pacientes con tumores epiteliales

ováricos malignos con otros factores angiogénicos. Obermair et al⁸¹ cuantifican el b-FGF por inmunoensayo, aportando tasas de supervivencias globales de 58,5% (≤ 500 pg/ml) (32 casos) y 38,8% (> 500 pg/ml) (32 casos), y en el análisis de multivariantes, sólo el tumor residual posquirúrgico y b-FGF fueron factores pronósticos. Arteaga et al⁸² analizan los valores de TGF- α en 29 pacientes con cánceres ováricos avanzados, detectándose en un 42% de derrames (25% pleurales) y estas mujeres tuvieron peores tasas de supervivencias ($p = 0,04$). Por el contrario, una publicación procedente de la Universidad de Minnesota (Mineápolis, EE.UU.)⁸³ valora los valores séricos de TGF- α (ELISA) en 25 controles, 36 cánceres ováricos (estadios III-IV), incluyendo a 33 pacientes sometidas a laparotomía de segunda mirada, sin encontrar diferencias significativas entre los grupos, y después de una media de seguimiento de 22,2 meses (rango, 1-60,5), las tasas de supervivencias en pacientes que no se detectó (18 casos) y se detectó TGF- α (18 casos) fueron de 23,1 y de 17,1 meses, respectivamente, sin diferencias significativas. Nakanishi et al⁵² realizan cuantificación de la expresión inmunohistoquímica de TGF- β (60 tumores) (56,7%), comunicando que las tasas de supervivencias para 34 estadios III fueron peores en tumores TGF- β positivos (19 casos) que negativos (15 casos) ($p < 0,05$).

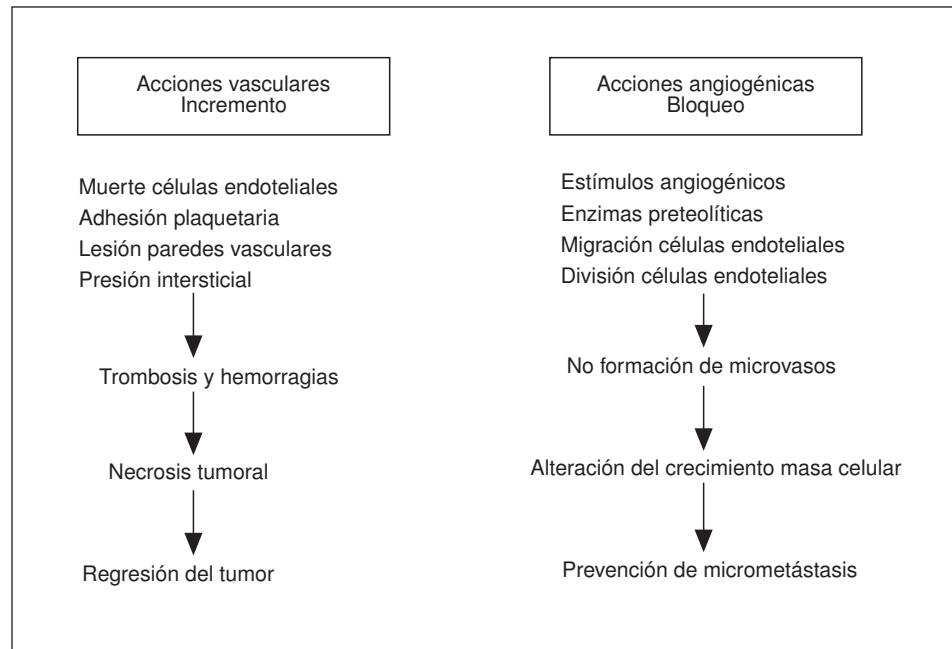


Fig. 5. Mecanismos de la terapia antiangiogénica.

IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS

Los acontecimientos que acompañan el rápido crecimiento y extensión de los tumores malignos todavía no son bien conocidos. La hipótesis de la secreción autocrina refiere que las células transformadas por los oncogenes pueden escapar a los mecanismos del crecimiento celular controlado, al producir de forma autónoma y también responder a sus propios factores de crecimiento⁸⁴. Desde hace muchos años, existe la impresión clínica de que a la resección de un tumor primario, sucede una fase caracterizada por incremento del crecimiento metastásico, pero hasta la fecha no existía explicación para este fenómeno. Ahora conocemos que el tumor primario intacto posee un único y complejo microambiente impuesto por la histología, densidad de la estroma, hipoxia, citocinas y otros factores, que pueden regular, directa o indirectamente, el crecimiento de sus metástasis⁸⁵.

El ambiente inmunológico de las primeras 24 h del trauma quirúrgico influye en las posteriores 3 semanas, durante las cuales existe una situación privilegiada para el desarrollo de micrometástasis latentes^{86,87}, ya que la extirpación quirúrgica tumoral modifica la fuente de los factores proangiogénicos y antiangiogénicos. Se ha demostrado que cuando las células tumorales alcanzan la herida laparotómica, incisión mama-

ria, o incluso con insuflación laparoscópica, dentro de las dos horas de poscirugía, la posibilidad de que éstas induzcan la creación de depósitos metastásicos latentes, está incrementada 1.000 veces en comparación con la cirugía de tejidos normales, lo que se debería al desencadenamiento temprano de estímulos angiogénicos (incremento de los valores sanguíneos de VEGF) y considerable disminución o desaparición, dentro de los 5 días de la extirpación del tumor primario, de factores antiangiogénicos (angiostatina y endostatina)^{88,89}.

En aproximadamente el 50% de pacientes sometidas a cirugía de tumor primario, el procedimiento no es curativo, al existir metástasis mínimas que no fueron detectadas por métodos clínicos. Por tanto, la terapia antiangiogénica está dirigida hacia pequeños focos de células en emigración y proliferación capilar, de aquí que la supresión de la angiogénesis en tumores ováricos con alta MVD, fuerte expresión inmunohistoquímica o molecular de VEGF o elevados valores séricos de VEGF, podría representar una opción terapéutica adicional para producir regresión del tumor mediante acciones vasculares, además de estabilizar las micrometástasis^{90,91}, a fin de conseguir enlentecer o frenar el crecimiento de las células tumorales (fig. 5), mostrándose más vulnerables a la acción destructiva de la terapia adyuvante (radiaciones, inmuno-

TABLA VI. Factores antiangiogénicos

Angiostatina
Endostatina
Factor plaquetario-4
Tromboespondina-1
Arrestina-26
Antitrombina-53
Inhibidores tisulares metaloproteinasas
Prolactina-16
Fibronectina-29
Protamina-22
Interleucinas 1-4-10-12-18
Talidomida
Vasoestatina
Interferones α , β y γ
Restina-22
Factor inhibidor del cartílago
Anticuerpo retinoico
Suramina
Angiopoyetina
Tamoxifeno
Fumagalina
Heparinasa
Metoxiestriadiol
Gen supresor p16
Factor de crecimiento de transformación $\beta 1$
Antígeno específico prostático
Gen supresor p53
Acetato medroxiprogesterona
Diclofenaco
Protamina

lógica, o fármacos citotóxicos). No debemos olvidar que los tumores en etapas precoces de la neovascularización ($< 1 \text{ ml}$) usualmente están bien perfundidos, pero el rápido crecimiento incrementa su presión intersticial y la terapia antiangiogénica reduce la presión, facilitando la acción de fármacos citotóxicos⁹².

La incipiente terapia antiangiogénica tiene ventajas e inconvenientes. Entre las primeras, destaca su empleo en diversas variedades histológicas de tumores, no causa supresión de la médula ósea ni síntomas gastrointestinales o pérdida de cabello, aunque inhibe la menstruación, carece de resistencias⁹³ y está contraindicada en mujeres gestantes. Mientras que entre los inconvenientes, debemos citar las dificultades para la producción de moléculas antiangiogénicas en grandes cantidades, una farmacocinética (vía-dosis) no bien aclarada necesita administración durante largo tiempo ($> 1 \text{ año}$) y a altas dosis con consecuencias económicas y, cuestión importante, todavía su eficacia clínica es incierta^{94,95}.

Hasta la fecha, más de 45 sustancias antiangiogénicas se han identificado en humanos, recibiendo la angiostatina y endostatina mayor atención por los investigadores (tabla VI). Alrededor de 25 diferentes

inhibidores de la angiogénesis han pasado estudios en fases I y II de tumores sólidos, incluyendo mama, colon, pulmón, próstata, sarcoma de Kaposi, etc.⁹⁶. La talidomida⁹⁷, el análogo sintético de la fumagalina (AGM-1470)⁹⁸, inhibidores de las metaloproteinasas (BB96, BB94)⁹⁹, TNP-470¹⁰⁰ o linomida¹⁰¹ han demostrado poca eficacia en ensayos de fase II de pacientes con cáncer ovárico. Existen diversos estudios en animales que emplean sustancias antiangiogénicas, principalmente anticuerpos-VEGF e inhibidores de las metaloproteinasas, remitiendo al lector a la consulta de una reciente revisión¹⁰². En las mujeres con cáncer de ovario, es frustrante el tratamiento de la ascitis y, en la mayoría de los casos, se limita al uso de paracentesis y diuréticos. Un estudio en fase I que incluye a 23 pacientes¹⁰³ utiliza BB94 intraperitoneal, sin destacables efectos secundarios, consiguiendo estabilizar la ascitis en 12 casos, encontrándose 5 pacientes vivas después de 112 días de la terapia. Xu et al¹⁰⁴ paralizan la ascitis maligna y crecimiento tumoral, mediante administración oral de PTK787, potente inhibidor del receptor VEGF. También se están utilizando anticuerpos monocionales anti-VEGF para alterar los receptores de los factores angiogénicos, manipulando varias citoquinas o los oligonucleótidos del ARNm-VEGF¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

Aunque una prometedora línea de investigación incluye la inhibición del gen VEGF, un nuevo campo terapéutico queda abierto con la terapia génica, actualmente orientada en dos direcciones para inducir la producción de inhibidores antiangiogénicos endógenos. La primera, se dirige directamente hacia el tumor, facilitando su actividad paracrina, con incremento de las concentraciones locales de agentes antiangiogénicos intratumorales, sin riesgo de toxicidad sistémica, detectada en algunos modelos preclínicos. La segunda, utiliza tejidos normales del paciente (p. ej., hígado) como factoría para conseguir aumentar los niveles circulantes del producto antiangiogénico¹⁰⁸. Sin embargo, la efectividad de la terapia génica directa tumoral puede estar limitada por la dificultad de llegada al tumor del vector (virales, como retrovirus y adenovirus con cierta toxicidad y no virales, liposomas, plásmidos ADN, etc.), debido al insuficiente suministro sanguíneo en la fase de crecimiento prevascular.

RESUMEN

Existen diferentes metodologías para el estudio de la angiogénesis tumoral, destacando el cálculo de la densidad de microvasos (MVD), técnicas inmunohistoquímicas o moleculares de expresión del factor de

crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en células tumorales y medición de valores de VEGF en líquidos tumorales, séricos y ascitis. Aparecen diferencias significativas de MVD, inmunoexpresión VEGF y expresión ARNm-VEGF entre tumores epiteliales ováricos benignos y malignos. En los carcinomas ováricos, se encuentran elevados valores séricos y en ascitis (pg/ml) de VEGF, así como de otros factores angiogénicos, respecto a los controles.

Los valores de MVD, expresión VEGF o concentraciones séricas de VEGF no se correlacionan con los estadios (FIGO) y subtipos histológicos de tumores epiteliales ováricos malignos, interesante circunstancia clínica, al ser el estadio de la enfermedad un clásico factor pronóstico. No existe relación significativa entre MVD y grados histológicos, sin embargo, los tumores G₃ presentan mayores porcentajes de expresión VEGF y valores séricos de VEGF, comparados con tumores G₁-G₂.

La mayoría de las publicaciones analizadas realizan variables dicotomizaciones de la MVD que dificultan la comparación de resultados, aunque los tumores ováricos con alta densidad de microvasos aportan peores tasas de supervivencias globales. Si aparece fuerte expresión inmunohistológica VEGF tumoral o aumento de niveles séricos de VEGF, se muestran como variables significativas en la mayoría de los análisis de multivariables, tanto para tasas de supervivencias globales como para supervivencias libres de enfermedad en mujeres portadoras de tumores epiteliales ováricos malignos.

La incipiente terapia antiangiogénica se dirige, en tumores ováricos con alta actividad angiogénica, hacia pequeños focos de células en emigración y proliferación capilar para que éstas sean más vulnerables a la acción de las terapéuticas adyuvantes, pero hasta la fecha, es incierta su eficacia clínica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Del Regato JA. Pathways of metastatic spread of malignant tumors. *Semin Oncol* 1977; 4: 33-38.
2. Fidler IJ, Gerstein DM, Hart IR. The biology of cancer invasion and metastasis. *Adv Cancer Res* 1978; 28: 149-250.
3. Mahadevan V, Hart IR. Metastasis and angiogenesis. *Acta Oncol* 1990; 29: 97-103.
4. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; 267: 1031-1034.
5. Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol* 1995; 147: 9-19.
6. Celorio A. Angiogénesis en el cáncer del cérvix uterino. *Clin Invest Gin Obst* 2000; 27: 343- 355.
7. Abulafia O, Sherer DM. Angiogenesis of the ovary. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182: 240-246.
8. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Monsell R, Siegel N, Haymore BL et al. Tumor vascular permeability factors stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 1989; 84: 1470-1478.
9. Rak J, Filmus J, Kerbel RS. Reciprocal paracrine interactions between tumor cells and endothelial cells «the angiogenesis progression» hypothesis. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 2438-2450.
10. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235: 442-447.
11. Berse B, Brown LF, Van de Water L, Dvorak HF, Senger DR. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell* 1992; 3: 211-220.
12. Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocrinol Rev* 1992; 13: 18-32.
13. Olson TA, Mohanraj D, Carson LF, Ramakrishnan S. Vascular permeability factor gene expression in normal and neoplastic human ovaries. *Cancer Res* 1994; 54: 276-280.
14. Lee J, Gray A, Yuan J, Luoh S-M, Avraham H, Wood WI. Vascular endothelial growth factor-related protein: a ligand and an specific activator of the tyrosine kinase receptor Flt-4. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 1988-1992.
15. Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res* 2000; 203-212.
16. Senger DR, Van de Water L, Brown LF, Nagy JA, Yeo K-T, Yeo T-K et al. Vascular permeability factor (VPF/VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev* 1993; 12: 303-324.
17. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hypermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995; 146: 1029-1039.
18. Shibuya M, Luo JC, Toyoda M, Yamaguchi S. Involvement of VEGF and its receptors in ascitis formation. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 43: S72-S77.
19. Levin ER. Endothelins. *N Engl J Med* 1995; 333: 356-363.
20. Bagnato A, Salani D, Di Castro V, Wu-Wong JR, Tecce R, Nicotra MR et al. Expression of endothelin-1 and endothelin A receptor in ovarian carcinoma: evidence for an autocrine role tumor growth. *Cancer Res* 1999; 59: 1-8.
21. Rifkin DB, Moscatelli D. Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor. *J Cell Biol* 1989; 106: 1-6.
22. Crickard K, Gross JL, Crickard U, Yoonessi M, Lele S, Herblin WF et al. Basic fibroblast growth factor and receptor expression in human ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1994; 55: 277-284.
23. Di Blasio AM, Cremonesi L, Viganó P, Ferrari M, Gospodarowicz D, Vignali M et al. Basic fibroblast growth factor and its receptor messenger ribonucleic acids are expressed in human ovarian epithelial neoplasms. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169: 1517-1523.
24. Haraguchi M, Miyadera K, Uemura K, Sumizawa, T, Furukawa T, Yamada K et al. Angiogenic activity of enzymes. *Nature* 1994; 368: 198.
25. Stromberg K, Collins TJ, Gordon AW, Jackson CL, Johnson GR. Transforming growth factor- α acts an autocrine growth factor in ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1992; 52: 341-347.
26. Massague J. The transforming growth factor- β family. *Ann Rev Cell Biol* 1990; 6: 597-641.

27. Hurteau J, Rodríguez GC, Whitaker RS, Shah S, Mills G, Bast RC et al. Transforming growth factor- β inhibits proliferation of human ovarian cancer cells obtained from ascites. *Cancer* 1994; 74: 93-99.
28. Lee J, Vilcek J. Biology of disease. Tumour necrosis factor and interleukin-1: cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab Invest* 1987; 56: 234-248.
29. Mukai K, Rosai J, Burgdorf WH. Localization of factor VIII-related antigen in vascular endothelial cells using an immunoperoxidase method. *Am J Surg Pathol* 1980; 4: 273-276.
30. Holthöffer H, Virtanen I, Kariniemi AL, Hormia M, Linde E, Miettinen A. Ulex europaeus I Lectin as marker for vascular endothelium in human tissues. *Lab Invest* 1982; 47: 60-66.
31. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 1996; 87: 1-13.
32. Longacre TA, Rouse RV. CD31: a new marker for vascular neoplasia. *Adv Anat Pathol* 1994; 1: 16-20.
33. Alles JU, Bosslet K. Immunohistochemical and immunochemical characterization of a new endothelial cell-specific antigen. *J Histochem Cytochem* 1986; 34: 209-214.
34. Weidner N. Current pathologic methods for measuring tumoral microvessel density within breast carcinoma and others tumors. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 36: 169-180.
35. Van Diest PJ, Van Dam P, Henzen-Lomans SC, Berns E, Van der Burgm J, Green J et al. A scoring system for immunohistochemical staining: consensus report of the task force for basic research of the EORTC-GCCG. *J Clin Pathol* 1997; 50: 801-804.
36. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumors: An international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 1996; 32: 2474-2484.
37. Hollingsworth HC, Kohn EC, Steinberg SM, Rothenberg ML, Merino M. Tumor angiogenesis in advanced ovarian carcinoma. *Am J Pathol* 1995; 147: 33-41.
38. Gasparini G, Bonaldi E, Viale G, Verderio P, Boracchi P, Panizzi GA et al. Prognostic and predictive value of tumor angiogenesis in ovarian carcinomas. *Int J Cancer* 1996; 69: 205-211.
39. Brustmann H, Riss P, Naudé S. The relevance of angiogenesis in benign and malignant epithelial tumors of the ovary: A quantitative histologic study. *Gynecol Oncol* 1997; 67: 20-26.
40. Abulafia O, Triest WE, Sherer DM. Angiogenesis in primary and metastatic epithelial ovarian carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177: 541-547.
41. Orre M, Lotfi-Miri M, Mamers P, Rogers PAW. Increased microvessel density in mucinous compared with malignant serous and benign tumors of the ovary. *Br J Cancer* 1998; 77: 2204-2209.
42. Darai E, Binguier A-F, Walker-Combrouze F, Fauconnier A, Couvelard A, Feldman G et al. CD31 expression in benign, borderline, and malignant epithelial ovarian tumors: an immunohistochemical and serological analysis. *Gynecol Oncol* 1998; 71: 122-127.
43. Alvarez AA, Krigman HS, Whitaker RS, Dodge RK, Rodriguez GC. The prognosis significance of angiogenesis in epithelial ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 587-591.
44. Hata K, Fujiwaki R, Maede Y, Nakayama K, Fukumoto M, Miyazaki K. Expression of thymidine phosphorylase in epithelial ovarian cancer: correlation with angiogenesis, apoptosis, and ultrasound-derived peak systolic velocity. *Gynecol Oncol* 2000; 77: 26-34.
45. Terai Y, Ueda M, Kumagai K, Ueki K, Ueki M. Tumor angiogenesis and thymidine phosphorylase expression in ovarian carcinomas including serous surface papillary adenocarcinoma of the peritoneum. *Int J Gynaecol Pathol* 2000; 19: 354-360.
46. Shen GH, Ghazizadeh M, Kawanami O, Shimizu H, Jin E, Araki T et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in human ovarian carcinoma. *Br J Cancer* 2000; 83: 196-203.
47. Salani D, Di Castro V, Nicotra MR, Rosano L, Tecce R, Venutti A et al. Role of endothelin-1 in neovascularization of ovarian carcinoma. *Am J Pathol* 2000; 157: 1537-1547.
48. Boocock CA, Charnock-Jones DS, Sharkey AM, McLaren J, Barker PJ, Wright K et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors flt, and KDR in ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 506-515.
49. Abu-Jawdeh GM, Faix JD, Niloff J, Tognazzi K, Mansseau E, Dvorak HF et al. Strong expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in ovarian borderline and malignant neoplasms. *Lab Invest* 1996; 74: 1105-1115.
50. Emoto M, Iwasaki H, Mimura K, Kawarabayashi T, Kikuchi M. Differences in the angiogenesis of benign and malignant ovarian tumors, demonstrated by analysis of color Doppler ultrasound, immunohistochemistry, and microvessel density. *Cancer* 1997; 80: 899-907.
51. Yamamoto S, Konishi I, Mandai M, Kuroda H, Komatsu T, Nanbu K et al. 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.
52. Nakanishi Y, Kodama J, Yoshinouchi M, Tokumo K, Kamimura S, Okuda H et al. The expression of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor- β associates with angiogenesis in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynaecol Pathol* 1997; 16: 256-262.
53. Orre M, Rogers PAW. VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, microvessel density and endothelial cell proliferation in tumors of the ovary. *Int J Cancer* 1999; 84: 101-108.
54. Garzetti GG, Ciavattini A, Lucarini G, Pugnaloni A, De Nicolis M, Amati S et al. Vascular endothelial growth factor expression as a prognostic index in serous ovarian cytoadenocarcinomas: relationship with MIB1 immunostaining. *Gynecol Oncol* 1999; 73: 396-401.
55. Paley PJ, Goff BA, Gown AM, Greer BE, Sage EH. Alterations in SPARC and VEGF immunoreactivity in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2000; 78: 336-341.
56. Hartenbach EM, Olson TA, Goswitz JJ, Mohanraj D, Twiggs LB, Carson LF et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and survival in human epithelial ovarian carcinomas. *Cancer Lett* 1997; 121: 169-175.
57. Henriksen R, Gobl A, Wilander E, Berg K, Miyazono K, Funai K. Expression and prognostic significance of TGF- β isotypes, latent TGF- β_1 binding protein, TGF- β type I and type II receptors, and endoglin in normal ovary and ovarian neoplasms. *Lab Invest* 1995; 73: 213-220.
58. Gordinier ME, Zhang H-Z, Patenia R, Levy LB, Atkinson EN, Nash MA et al. Quantitative analysis of transforming growth factor β_1 and β_2 in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2498-2505.
59. Reynolds K, Farzaneh F, Collins WP, Campbell S, Bourne TH, Lawton F et al. Association of ovarian malignancy with expression of platelet-derived endothelial cell growth factor. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 1234-1238.
60. Sowter HM, Corps AN, Evans AL, Clark DE, Charnock-Jones DS, Smith SK. Expression and localization of the

- vascular endothelial growth factor family in ovarian epithelial tumors. *Lab Invest* 1997; 77: 607-614.
61. Paley PJ, Staskus KA, Gebhard K, Mohanraj D, Twiggs LB, Carson LF et al. Vascular endothelial growth factor expression in early stage ovarian carcinoma. *Cancer* 1997; 80: 98-106.
 62. Bartlett JM, Langdon SP, Scott WN, Love SB, Miller EP, Katsaros JF et al. Transforming growth factor- β isoform expression in human ovarian tumours. *Eur J Cancer* 1997; 33: 2397-2403.
 63. Fujimoto J, Sakaguchi H, Hirose R, Ichigo S, Tamaya T. Biologic implications of the expression of vascular endothelial growth factor subtypes in ovarian carcinoma. *Cancer* 1998; 83: 2528-2533.
 64. Fujimoto J, Ichigo S, Hori M, Hirose R, Sakaguchi H, Tamaya T. Expression of basic fibroblast growth factor and its mRNA in advanced ovarian cancers. *Eur J Gynecol Oncol* 1997; 18: 349-352.
 65. Hazelton D, Nicosia RF, Nicosia SV. Vascular endothelial growth factor levels in ovarian cyst fluid correlate with malignancy. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 823-829.
 66. Barton DJ, Cai A, Wendt K, Young M, Gamero A, De Cesare S. Angiogenic protein expression in advanced epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 1997; 9: 1579-1586.
 67. Obermair A, Tempfer C, Heffler L, Preyer O, Kaider A, Zeillinger R. Concentration of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the serum of patients with suspected ovarian cancer. *Br J Cancer* 1998; 77: 1870-1874.
 68. Chen Ch-A, Cheng W-F, Lee Ch-N, Chen T-M, Kung Ch-Ch, Hsieh F-J. Serum vascular endothelial growth factor in epithelial ovarian neoplasms: correlation with patient survival. *Gynecol Oncol* 1999; 74: 235-240.
 69. Santin AD, Hermonat PL, Ravaggi A, Cannon MJ, Pecorelli S, Parham GP. Secretion of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* 1999; 20: 177-181.
 70. Kraft A, Weindel K, Ochs A, Marth C, Zmija J, Schumacher P, et al. Vascular endothelial growth factor in the sera and effusions of patients with malignant and nonmalignant disease. *Cancer* 1999; 85: 178-187.
 71. Oehler MK, Caffier H. Diagnostic value of serum VEGF in women with ovarian tumors. *Anticancer Res* 1999; 19: 2519-2522.
 72. Zebrowski BK, Liu W, Ramírez K, Akagi Y, Mills GB, Ellis LM. Markedly elevated levels of vascular endothelial growth factor in malignant ascitis. *Ann Surg Oncol* 1999; 6: 373-378.
 73. Van Diest PJ, Zehering JP, Zehering LC, Baak JPA. Prognostic value of microvessel quantitation in cisplatin treated FIGO 3 and 4 ovarian cancer patients. *Pathol Res Pract* 1995; 191: 25-30.
 74. Heimburg S, Oehler MK, Papadopoulos T, Caffier H, Kristen P, Dietl J. Prognostic relevance of the endothelial marker CD34 in ovarian cancer. *Anticancer Res* 1999; 19: 2527-2529.
 75. Tempfer C, Obermair A, Heffler L, Haeusler G, Gitsch G, Kainz C. Vascular endothelial growth factor serum concentrations in ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 1998; 92: 360-363.
 76. Chopra V, Dinh TV, Hannigan EV. Angiogenesis, interleukins, and growth-factor levels in serum of patients with ovarian cancer: correlation with angiogenesis. *Can J Sci Am* 1996; 2: 279-285.
 77. Mattern J, Stammler G, Koomagi R, Wallwiener D, Kaufmann M, Volm M. Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor cell proliferation in ovarian carcinoma. *Anticancer Res* 1997; 17: 621-624.
 78. Schoell WMJ, Pieber D, Reich O, Lahousen M, Janicek M, Guecer F et al. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in ovarian carcinoma: Quantification of endothelial immunoreactivity by image analysis. *Cancer* 1997; 80: 2257-2262.
 79. Moreno A, Vidart JA, González L, Asenjo JA, Furio V, Coronado PJ et al. La medición de la angiogénesis tumoral como factor pronóstico eficaz para conocer el cáncer de ovario. Resultados preliminares. *Acta Obstet Gynecol* 2000; 13: 326-330.
 80. Cox DR. Regression models and life tables. *J R Stat Soc* 1972; 34: 187-202.
 81. Obermair A, Speiser P, Reisenberger K. Influence of intratumoral basic fibroblast growth factor concentration on survival in ovarian cancer patients. *Cancer Lett* 1998; 130: 69-76.
 82. Arteaga CL, Hanauske AR, Clark GM, Osborne CK, Hazarika P, Pardue RL et al. Immunoreactive a transforming growth factor activity in effusions from cancer patients as a marker of tumor burden and patient prognosis. *Cancer Res* 1988; 48: 5023-5028.
 83. Saltzman A, Hartenbach E, Carter JR, Contreras DN, Twiggs LB, Carson LF et al. Transforming growth factor- α levels in the serum and ascites of patients with advanced epithelial ovarian cancer. *Gynecol Obstet Invest* 1999; 47: 200-204.
 84. Sporn MB, Roberts AB. Autocrine growth factors and cancer. *Nature* 1985; 313: 745-747.
 85. Folkman J. Angiogenesis inhibitors generated by tumors. *Mol Med* 1995; 1: 120-122.
 86. Murthy MS, Goldschmidt RA, Rao CN, Ammirati M, Buchmann T, Scanlon EF. Influence of surgical trauma on experimental metastasis. *Cancer* 1989; 64: 2035-2044.
 87. Jiang WG, Puntis MLA, Hallett MB. Molecular and cellular basis of cancer invasion and metastasis: implications for treatment. *Br J Surg* 1994; 81: 1576-1579.
 88. Skipper D, Jeffrey MJ, Cooper AJ, Alexander P, Taylor I. Enhanced growth of tumour cells in healing colonic anastomoses and laparotomy wounds. *Int J Colorectal Dis* 1989; 4: 172-177.
 89. Da Costa ML, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ. Increased tumor establishment and growth after laparotomy vs laparoscopy. *Arch Surg* 1996; 131: 1003.
 90. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastasis balanced proliferation and apoptosis in presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1995; 1: 149-153.
 91. Liotta LA, Steeg PS, Stettler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991; 64: 327-336.
 92. Teicher BA, Sotomayor EA, Huang ZD. Antiangiogenic agents potentiate cytotoxic cancer therapies against primary and metastatic disease. *Cancer Res* 1992; 52: 6702-6704.
 93. Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 1997; 390: 404-407.
 94. Feldman A, Libutti SK. Progress in antiangiogenic gene therapy of cancer. *Cancer* 2000; 89: 1181-1194.
 95. Baillie CT, Winslett MC, Bradley NJ. Tumor vasculature: A potent therapeutic target. *Br J Cancer* 1995; 72: 257-267.
 96. Harris AL. Antiangiogenesis for cancer therapy. *Lancet* 1997; 349: 13-15.
 97. Eisen T, Boshoff C, Mak I, Sapunar F, Vaughan MM, Pyle L et al. Continuous low dose thalidomide: a phase II study

- in advanced melanoma, renal cell, ovarian and breast cancer. *Br J Cancer* 2000; 82: 812-817.
98. Klauber N, Rohan RM, Flynn E, D'Amato RJ. Critical components of the female reproductive pathway are suppressed by the angiogenesis inhibitor AGM-1470. *Nat Med* 1997; 3: 443-446.
 99. Beattie GJ, Young HA, Smythe JF. Phase I study of intraperitoneal metalloproteinase inhibitor BB96 in patients with malignant ascitis [resumen]. *Ann Oncol* 1994; 5: 72.
 100. Teicher BA, Holden SA, Ara G, Sotomayor EA, Huang ZD, Chen YN et al. Potentiation of cytotoxic cancer therapies by TNP-470 alone and with other anti-angiogenic agents. *Int J Cancer* 1994; 57: 920-925.
 101. Vukanovic J, Passaniti A, Hirata T, Traystmann RJ, Hartley-Asp B, Isaacs JT. Antiangiogenic effects of the quinoline-3-carboxamide linomide. *Cancer Res* 1993; 53: 1833-1837.
 102. Sherer DM, Eliakim R, Abulafia O. The role of angiogenesis in the accumulation of peritoneal fluid in benign conditions and the development of malignant ascitis in the female. *Gynecol Obstet Invest* 2000; 50: 217-224.
 103. Beattie GJ, Smythe JF. Phase I study of intraperitoneal metalloproteinase inhibitor BB94 in patients with malignant ascitis. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 1899-1902.
 104. Xu L, Yoneda J, Herrera C, Wood J, Killion JJ, Fidler IJ. Inhibition of malignant ascitis and growth of human ovarian carcinoma by oral administration of a potent inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor tyrosin kinase. *Int J Oncol* 2000; 16: 445-454.
 105. Hori A, Sasada R, Matsutani E, Naito K, Sakura Y, Fujita T. Suppression of solid tumor growth by immuno-neutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor. *Cancer Res* 1991; 51: 6180-6184.
 106. Kim KJ, Winner J, Armanini M, Guillet N, Phillips HS, Ferrara N. Inhibition of vascular endothelial growth factor induced angiogenesis suppresses tumor growth *in vivo*. *Nature* 1993; 362: 841-844.
 107. Martiny-Baron G, Marme D. VEGF-mediated tumour angiogenesis: a new target for cancer therapy. *Curr Opin Biotechnol* 1996; 6: 675-680.
 108. Kong H-L, Crystal RG. Gene therapy strategies for tumor-antiangiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 273-286.