

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE ENGENHARIA

CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA

ANGIOGÊNESE OVARIANA

HELLEN THAIS FERREIRA

1210001475



1475

**ILHA SOLTEIRA/SP
2003**



UNESP
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ENGENHARIA
CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA

1210001475



ANGIOGÊNESE OVARIANA

Proc. 063/04 - NPD 51

UNESP - "CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA"	
SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO	
DATA DE CHECAGEM	DATA DE TOMBO
13/10/03	31.03.04
REGISTRADO POR	TOMBO
Aulza	Te. 1475
AQUISIÇÃO	CLASSIFICAÇÃO
Wooce autor R\$ 10,00	F383a

AUTORA: HELLEN THAIS FERREIRA

ORIENTADOR: Dr. MILTON PASSIPIERI

co
445 214 564
445 56 113
Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia – UNESP/Câmpus de Ilha Solteira, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia - Área de Concentração: Sistema de Produção Animal.

ILHA SOLTEIRA - SP
2003

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ENGENHARIA
CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA

ANGIOGÊNESE OVARIANA

UNESP - CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA	
SERVIÇO DE REGISTRO E DOCUMENTAÇÃO	
DATA DE REGISTRO	DATA DE RECEBIMENTO
09/04/03	09/04/03
RECEBIDO	RECEBIDO
09/04/03	09/04/03
CLASSIFICAÇÃO	CLASSIFICAÇÃO

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação/Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da FEIS/UNESP

Ferreira, Hellen Thais

F383a Angiogênese ovariana / Hellen Thais Ferreira. – Ilha Solteira : [s.n.], 2003
xi, 26 p. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de concentração: Sistemas de Produção Animal, 2003.

Orientador: Milton Passipieri

Bibliografia: p. 24-26

1. Neovascularização. 2. Corpo lúteo. 3. Fator de crescimento. 4. Ovários.
5. Ovulação.

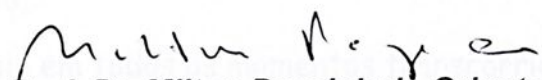
50504010

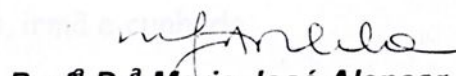
ANGIOGÊNESE OVARIANA

HELLEN THAIS FERREIRA

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À UNESP - CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA
COMO PARTE DOS REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE EM ZOOTECNIA

COMISSÃO EXAMINADORA:


Prof. Dr. Milton Passipieri - Orientador


Prof.ª Dr.ª Maria José Alencar Vilela


Prof. Dr. Edson Guilherme Vieira

**Ilha Solteira – SP
agosto de 2003**

Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Cursos: Agronomia, Ciências Biológicas, Eng. Civil, Eng. Elétrica Eng. Mecânica, Física, Matemática e Zootecnia.
Avenida Brasil Centro, 56 Caixa Postal 31 CEP 15385-000 Ilha Solteira São Paulo Brasil
pabx 18 3743 1000 fax 18 3742 2735 scom@adm.feis.unesp.br www.feis.unesp.br

DEDICO

À minha mãe,
Nadir,
por seus sonhos abdicados por mim,
pelo amor, exemplo de vida e principalmente pela minha formação moral.

Ao meu namorado Paulo Altarugio
pelo amor, paciência e compreensão em todos os momentos
principalmente os mais difíceis durante essa jornada.

Ao meu pai Jerônimo,
pelo carinho, apoio em todos os momentos transcorridos.

Aos meus sobrinhos, irmã e cunhado,
pela alegria a mim proporcionada.



AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida;

A minha mãe Nadir que sempre me incentivou e me apoiou, nunca medindo seus esforços para que esse trabalho fosse concretizado e ao meu pai Jerônimo pelo ajuda e carinho dada a mim.

Ao Prof. Milton Passipiéri, um agradecimento em especial pelo constante incentivo, competência e dedicação em suas orientações durante o transcorrer deste trabalho, e também pela paciência, compreensão e confiança em mim depositada.

Ao meu namorado Paulo pelo amor, carinho, apoio, compreensão e incentivo em todos os momentos principalmente nos mais difíceis enfrentados durante o transcorrer deste trabalho de pesquisa.

A minha irmã Imara Lucia F. Ribeiro e amiga Sebastiana, pelas palavras de incentivo nas horas difíceis.

Aos Profs. do Departamento de Biologia e Zootecnia da UNESP- Campus de Ilha Solteira, pela oportunidade e contribuição para a realização deste curso.

Aos funcionários de Seção de Pós-Graduação da UNESP - Campus de Ilha Solteira e do Departamento de Biologia e Zootecnia, Arlindo Avanzo Urzulin, Adelaide Amaral dos Santos Passipiéri, Maria Fátima Sabino, Meiri Sayuri Nishida Máximo da Cruz e Zeneide Ribeiro Campos, que direta ou indiretamente colaboraram para a realização e pela atenção sempre solícita.



Aos funcionários da Biblioteca, representados por João Josué Barbosa, pela orientação sempre solícita.

Aos meus maravilhosos amigos da Pós-Graduação, que compartilhei vários momentos durante essa caminhada.

A todos amigos e colegas que me deram muita força e alegria, em especial aos que estiveram mais presentes: - Mônica, Priscila e a pequena Beatriz.



*Não basta ensinar ao homem uma especialidade,
porque se tornará assim uma máquina utilizável
e não uma personalidade.
É necessário que adquira um sentimento,
um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido,
daquilo que é belo, do que é moralmente correto.*

Albert Einstein



SUMÁRIO

Página

LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1 - INTRODUÇÃO	01
2 - REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1 - Mecanismo da Angiogênese	03
2.2 - Fatores estimuladores e inibidores da angiogênese.....	06
2.2.1 - Fator de crescimento fibroblástico (FGF)	09
2.2.1.1 - Fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF).....	10
2.2.1.2 - Fator de crescimento fibroblástico ácido (aFGF)	12
2.2.2 - Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	12
2.2.3 - Fator de crescimento Transformante- β (TGF- β)	13
2.2.4 - Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF)	14
2.2.5 - Fator de crescimento endotelial ou epidérmico (EGF) e Fator de crescimento transformante- α (TGF- α)	14
2.2.6 - Fator de necrose tumoral- α (TGF- α)	15
2.2.7- Prostaglandinas e outros lipídeos	16
2.2.8 - Angiogenina e Fator de crescimento derivado de plaquetas.....	16
2.3 - ANGIOGÊNESE OVARIANA	17
3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
4 - REFERÊNCIAS	24

LISTA DE FIGURAS

Página

- FIGURA 1 - Esquema ilustrando os componentes estruturais microscópicos da parede vascular de um vaso sanguíneo em corte transversal à esquerda e em corte longitudinal, com destaque para a monocamada de células endoteliais localizada entre o leito vascular e a estrutura externa de suporte 03
- FIGURA 2 - Ilustração sobre o mecanismo da angiogênese em dez etapas. 05
- FIGURA 3 - Folículos ovarianos em diferentes fases de desenvolvimento 18
- FIGURA 4 - Esquema da rede capilar da teca interna e da camada avascular da camada das células da granulosa 19
- FIGURA 5 - Diagrama mostrando a organização celular e a angiogênese do corpo lúteo..... 20

RESUMO

A angiogênese é um processo de neovascularização, ou a formação de novos vasos sangüíneos a partir de vasos preexistentes, que ocorre normalmente na cicatrização de feridas e no sistema reprodutor feminino. Embora seja um processo bem regulado, a estimulação ou inibição de angiogênese anormal ocorre em muitas doenças. Novos vasos sangüíneos são formados quando as células endoteliais e os pericitos (células musculares de suporte), que formam o revestimento interno e externo dos vasos, crescem em resposta a fatores ou sinais específicos. O mecanismo da angiogênese inicia-se após um estímulo e possui três etapas principais: degradação da membrana basal, migração e proliferação de células endoteliais. O estímulo é produzido por fatores de crescimento ligados a receptores específicos na superfície da célula endotelial. A degradação da membrana basal ocorre após a secreção de enzimas pelas próprias células endoteliais. Na seqüência, as células endoteliais migram através da membrana basal degradada e paralelamente proliferam em direção ao estímulo, resultando em um novo ramo do vaso capilar. A angiogênese é regulada por uma série complexa de fatores de crescimento, incluindo estimuladores e inibidores. Recentemente foram citados 19 fatores estimuladores e 27 fatores inibidores da angiogênese. Fatores de crescimento são proteínas e polipeptídeos semelhantes a hormônios, de peso molecular que varia de 15 a 20 kDa, e que possuem ações parácrinas e autócrinas ao promoverem atividade mitogênica na proliferação e remodelação no tecido local como, por exemplo, a transformação do folículo ovariano em um corpo lúteo. No ovário, ocorre alteração vascular de forma cíclica. A angiogênese ovariana inicia-se no folículo primário (pré-antral) e o desenvolvimento vascular do folículo ovariano torna-se mais acentuado após a ovulação, associado com o desenvolvimento do corpo lúteo, e termina na regressão do corpo lúteo, seja durante um ciclo ovariano ou na fase final da gestação ou logo após o

parto. Foi constatado que folículos ovarianos e corpos lúteos contêm e produzem fatores angiogênicos e que pelo menos 20 fatores de crescimento e inibidores angiogênicos estão direta ou indiretamente ligados à angiogênese ovariana, como por exemplo o fator de crescimento fibroblástico ácido (aFGF), fator de crescimento fibroblástico básico bFGF), fator de crescimento transformante- α (TGF- α), fator de crescimento transformante - β (TGF- β), fator de necrose de tumor- α (TNF- α), angiogenina, interleucina-8 (IL-8), fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), também conhecido como fator de crescimento vascular (VPF), e as angiopoietinas 1 e 2. Embora não hajam citações sobre fatores angiogênicos específicos para o ovário, foi citado que o fator de crescimento de permeabilidade vascular (VEGF), que é sintetizado pelas células produtoras de hormônios do folículo e corpo lúteo, é um fator de crescimento fundamental na angiogênese ovariana.

Palavras-chave: angiogênese, corpo lúteo, fator de crescimento, ovário.

ABSTRACT

The angiogenesis is a neovascularization process, or the formation of new blood vessels from preexisting vessels, and it usually happens in the tissue repair of wounds and in the female reproductive tract. Although it is a well regulated process, the stimulation or inhibition of abnormal angiogenesis happens in a lot of diseases. New blood vessels are formed when the endothelial cells and the pericytes (muscular cells of support) which form the internal and external layers of the vessels grow in response to specific factors or signs. The mechanism of the angiogenesis begins after stimulation and it possesses three main stages: Degradation of the basal membrane, migration and proliferation of endothelial cells. The stimulation is produced by growth factors linked to specific receptors in the surface of the endothelial cells. The degradation of the basal membrane happens after the secretion of enzymes by the endothelial cells. In the migration, the endothelial cells migrate through the degraded basal membrane and simultaneously proliferate towards the stimulation, resulting in a new branch of the capillary vase. The angiogenesis is regulated by a complex series of growth factors, including stimulators and inhibitors. Recently 19 stimulating factors and 27 inhibiting factors of the angiogenesis were mentioned. Growth factors are proteins and polypeptides similar to hormones, with 15 to 20 KDa of molecular weight, which possess paracrine and autocrine actions when promoting mitogenic activity in growing and remodeling the local tissue, as the transformation of the ovarian follicle in a corpus luteum. In the ovary, vascular alteration happens in a cyclical way. The ovarian angiogenesis begins in the primary follicle (pre-antral) and the vascular development of the ovarian follicle becomes more accentuated after the ovulation, associated with the development of the corpus luteum, and it finishes in the regression of the corpus luteum during an ovarian cycle, in the end of the pregnancy or soon after the parturition. It was

verified that ovarian follicles and corpora lutea contain and produce angiogenic factors and that at least 20 growth factors and angiogenic inhibitors are direct or indirectly linked to the ovarian angiogenesis, such as the acid fibroblastic growth factor (aFGF), basic fibroblastic growth factor (bFGF), transforming- α growth factor (TGF- α), transforming- β growth factor (TGF- β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), angiogenin, interleukin-8 (IL-8), Platelet-derived growth factor (PDGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), also known as vascular growth factor (VPF), and the angiopoietins 1 and 2. Although there are no citations about specific angiogenic factors for the ovary, it was mentioned that the vascular permeability growth factor (VEGF), which is synthesized by the hormone producing cells from follicle and corpus luteum, is an essential growth factor in the ovarian angiogenesis.

Keywords: angiogenesis, corpus luteum, growth factor, ovary



1 - INTRODUÇÃO

A neovascularização ou a formação de novos vasos sangüíneos pode ser composta por dois processos biológicos distintos: vasculogênese e angiogênese. Na vasculogênese ocorre a formação de vasos sangüíneos, como é observada durante a embriogênese, onde precursores das células endoteliais, denominados de angioblastos, surgem no mesoderma da vesícula vitelínica. Os angioblastos organizam-se em agregados celulares ou ilhotas sangüíneas, diferenciando-se em uma rede vascular primordial, onde os canais endoteliais apresentam tamanho relativamente uniforme. Posteriormente, ocorre a angiogênese, que é o processo que requer uma cascata de eventos pelos quais novos vasos capilares se desenvolvem a partir de vasos preexistentes (DVORAK, 2000, p. 75-78), envolvendo a proliferação de células endoteliais, sua migração e formação de estruturas vasculares rudimentares, acompanhadas de remodelação da matriz extracelular (FERRARA et al. 1998, p. 337-340).

A remodelagem vascular envolve tanto o crescimento como a regressão de vasos, eventos fisiológicos importantes principalmente na embriogênese, durante o crescimento de tecidos e órgãos dos diferentes sistemas orgânicos. A remodelagem seguida do crescimento vascular também está presente no adulto, por exemplo, no crescimento dos cabelos, na cicatrização e no ciclo reprodutivo feminino (FERRARA, 2000, p. 15-35), na vascularização do ovário durante o desenvolvimento folicular e formação do corpo lúteo, no endométrio uterino durante a fase proliferativa do ciclo estral ou menstrual, na placenta e glândulas mamárias (REYNALDS et al. 2000, p. 1-9).

Embora estes processos sejam normalmente regulados, a estimulação ou inibição de angiogênese anormal pode acontecer em muitas doenças. Na área reprodutiva feminina, defeitos em angiogênese podem contribuir para uma variedade de desordens (GORDON et al. 1995, p. 688-697), incluindo insuficiência do corpo lúteo, síndrome da



hiperestimulação ovárica após a ovulação induzida, hemorragia uterina disfuncional, endometrioses, gestação interrompida, doenças materno-fetais e câncer ginecológico (GEVA e JAFFE, 2000, p. 511-519). A angiogênese prolongada e acentuada também está relacionada com muitas outras patologias, entre as quais desordens inflamatórias, a endometriose (crescimento do tecido endometrial na cavidade peritoneal), as retinopatias (neovascularização do olho e cegueira em quadros de diabetes), a artrite reumatóide (condição inflamatória na qual capilares sanguíneos invadem e destroem a cartilagem das articulações), a psoríase (doença inflamatória da pele, onde as lesões são caracterizadas pelo aumento do calibre e do comprimento de vasos presentes na derme e em tumores em crescimento) (DIAS et al., 2002).

Este trabalho teve como objetivo realizar uma revisão sobre o mecanismo da angiogênese, os principais fatores estimuladores e inibidores da angiogênese e a angiogênese ovariana.



2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - MECANISMO DA ANGIOGÊNESE

No organismo, os vasos capilares integram uma rede de quilômetros de vasos responsáveis pelo fluxo do sangue e pela perfusão tecidual nos diversos sistemas. Os vasos estão organizados em uma monocamada de células endoteliais (DIAS et al., 2002), revestidas por matriz extracelular, composta por moléculas de colágeno, elastina, glicoproteínas e proteoglicanas, e células com função de suporte (Figura 1). A camada de células endoteliais no homem adulto recobre aproximadamente 1000 m² de superfície interna dos vasos (THE ANGIOGENESIS FOUNDATION, 2003).

Em vasos capilares maduros, ou seja, já diferenciados, a parede do vaso compõe-se de uma fileira de células endoteliais, uma membrana basal e uma camada de células musculares de suporte chamadas pericitos que cerca parcialmente o endotélio.

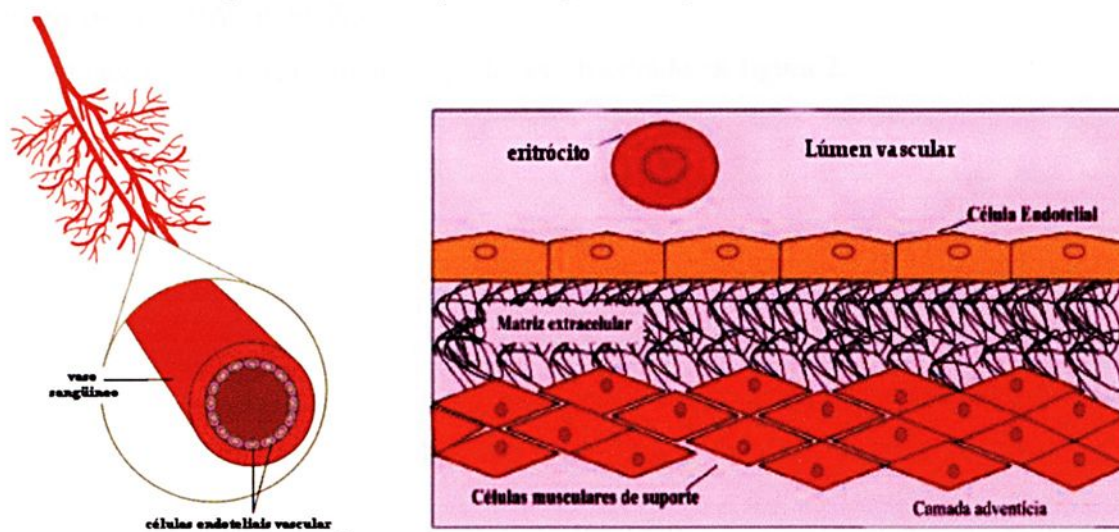


FIGURA 1 - Esquema ilustrando os componentes estruturais microscópicos da parede vascular de um vaso sanguíneo em corte transversal à esquerda e em corte longitudinal, com destaque para a monocamada de células endoteliais localizada entre o leito vascular e a estrutura externa de suporte.

O entendimento dos mecanismos celulares envolvidos na vascularização lança perspectivas sobre a promoção do crescimento vascular no restabelecimento do tecido isquêmico e o bloqueio do crescimento de vasos para conter o avanço de patologias, como o câncer. Em condições normais, as células endoteliais proliferam em um ritmo muito lento, apresentando longevidade acentuada. Quando as células endoteliais estão sujeitas a eventuais falhas e interferências na sinalização responsável pela sua estabilização, que é uma condição em que as células suporte periendoteliais são recrutadas para a parede do vaso e a matriz extracelular é reconstituída, normalmente ficam sujeitas a apoptose (morte celular programada, ocasionada pelo desligamento das células de seu suporte na matriz extracelular), com a conseqüente regressão dos vasos sangüíneos. Esse processo de falha na sinalização sujeitando-as a apoptose e a regressão constituem uma alternativa à divisão (mitose) e à diferenciação celular. A redução na adesão celular, durante o processo de remodelagem, também é imprescindível na fase de crescimento dos vasos (a ramificação angiogênica), pois as células se tornam mais acessíveis aos fatores de crescimento vascular. O equilíbrio dinâmico necessário à manutenção do sistema biológico é viabilizado pelas moléculas sinalizadoras, de natureza pró e anti-angiogênica. Esse equilíbrio está baseado na coexistência desses sinais angiogênicos e angiostáticos (inibidores da angiogênese) em concentrações estritamente controladas, interagindo por sua vez com moléculas e receptores membranosos e intracelulares, através dos quais as células interagem em seu microcosmo (DIAS et al. 2002).

O mecanismo da angiogênese pode ser observado na figura 2.



FIGURA 2 - Ilustração sobre o mecanismo da angiogênese em dez etapas.

Novos vasos sanguíneos são formados quando as células endoteliais e os pericitos (células musculares de suporte) que formam o revestimento interno e externo dos vasos crescem em resposta a fatores ou sinais específicos (DIAS et al. 2002). Tecidos traumatizados ou doentes (sinal, estímulo) produzem e liberam fatores de crescimento angiogênicos (proteínas) que se difundem no tecidos vizinhos. Os fatores de crescimento angiogênicos ligam-se a receptores específicos localizados nas células endoteliais (CE) de vasos sanguíneos próximos ao local. A partir daí inicia-se o processo fisiológico conhecido como angiogênese onde, após a ligação dos fatores de crescimento aos seus receptores nas células endoteliais, estas são ativadas e iniciam a produção de novas moléculas, inclusive enzimas, que irão dissolver a membrana basal que cerca o vaso para posteriormente ocorrer a migração e proliferação destas células endoteliais, atravessando os espaços dissolvidos da membrana, formando assim um novo ramo em direção ao estímulo (sinais). Moléculas especializadas chamadas de moléculas de adesão ou integrinas (avb3, avb5) atuam como ganchos que ajudam o broto a crescer na direção desejada. Enzimas adicionais (metaloproteases) são produzidas para dissolver o tecido em frente do broto a fim de acomodá-lo. À medida que o vaso avança, o tecido é remodelado a sua volta e as células endoteliais do broto se organizam para formar gradualmente em seu interior um lúmen do vaso sanguíneo. Desta forma vão se gerando tubos ocos que anastomosam uns aos outros formando fracos capilares, que são estabilizados por células musculares especializadas (célula

muscular lisa, pericitos), que fornecem apoio estrutural para que possa enfim obter o fluxo sanguíneo (THE ANGIOGENESIS FOUNDATION, 2003). Dos capilares recém-formados podem surgir novos ramos dando lugar, eventualmente, a formação de uma rede capilar completa (PAREDES, 2002).

2.2 - FATORES ESTIMULADORES E INIBIDORES DA ANGIOGÊNESE

Fatores de crescimento são proteínas e polipeptídeos semelhantes a hormônios, os quais são parácrinos e autócrinos em promover atividade mitogênica na proliferação e remodelação no tecido local, como por exemplo, a transformação do folículo ovariano em um corpo lúteo (HAFEZ, 1995).

Vários fatores de crescimento são polipeptídeos de peso molecular que varia de 15 a 20 kDa (GORDON et al. 1995, p. 688-697). Estes fatores se ligam a receptores na superfície celular, com o resultado primário de ativar a proliferação e/ou diferenciação celular, sendo muitos fatores de crescimento bastante versáteis, estimulando a divisão celular em numerosos tipos celulares diferentes, enquanto outros estimulam a diferenciação em células específicas (COPE, 2003).

A angiogênese é regulada por uma série complexa de fatores de crescimento, incluindo estimuladores e inibidores (FRASER e LUNN, 2000, p. 787-797). Segundo The Angiogenesis Foundation (2003), a angiogênese é controlada por uma série de interruptores de “liga” e “desliga”, onde os principais interruptores de ligar são conhecidos como fatores de crescimento estimuladores da angiogênese e os principais interruptores de desligar são conhecidos como inibidores da angiogênese.

A regulação da neovascularização é um processo dinâmico e representa um equilíbrio entre a estimulação e inibição da angiogênese. Assim, fatores que inibem a angiogênese podem ser necessários para manter o crescimento normal, ou seja, em condições fisiológicas do vaso sanguíneo e, assim, prevenir a neovascularização anormal (GORDON et al. 1995, p. 688-697).

Moléculas estimuladoras da angiogênese específicas podem iniciar este processo que moléculas inibidoras podem deter. Estas moléculas com funções opostas atuam continuamente de forma combinada, em um sentido ou outro, dependendo das necessidades fisiológicas. Assim, podem fazer com que uma rede vascular se mantenha em um estado quiescente, como podem provocar uma rápida proliferação das células

vasculares, como ocorre, por exemplo, na reparação tecidual (cura de ferida) (PAREDES, 2002). Quando são produzidos fatores de crescimento angiogênico (estimuladores) em maior quantidade em relação aos inibidores, o equilíbrio é inclinado a favor do crescimento do vaso sanguíneo. Quando a situação é inversa, ou seja, quando há mais inibidores presentes, a angiogênese é cessada (THE ANGIOGENESIS FOUNDATION, 2003). Existem numerosas moléculas capazes de induzir angiogênese, a maior parte delas são proteínas. Muitas destas proteínas angiogênicas são fatores de crescimento bem conhecidos, como o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Outras são citocinas, proteases (ativadores de plasminogênio) e outras proteínas como a angiotensina e a haptoglobina. Também existem indutores da angiogênese de natureza química não protéica, como é o caso do lactato, ADP, prostaglandina e até elementos como o selênio. Da mesma forma, são identificados numerosos fatores inibidores da angiogênese (PAREDES, 2002).

O desenvolvimento de ensaios *in vivo* e *in vitro* nas últimas duas décadas mostrou o possível isolamento e caracterização de fatores angiogênicos e antiangiogênicos em numerosos tecidos. Os métodos *in vivo* foram usados para avaliar a habilidade de um fator para influenciar a neovascularização, quer dizer, influenciar o processo inteiro de angiogênese. Em contraste com a técnica *in vivo*, o ensaio *in vitro* avalia a habilidade de influência de alguns fatores em um dos componentes individuais do processo angiogênico. Estes ensaios testam a habilidade de uma substância para influenciar: (1) produção de proteases através de células endoteliais, (2) uma migração de células endoteliais, ou (3) proliferação de células endoteliais. Porém, a atividade de fatores angiogênicos identificada em ensaios *in vitro* precisa ser confirmada com um bioensaio *in vivo* (REDMER e REYNALDS, 1996, p. 182-192).

Ferrara (1999, p. 794-814) identificou vários reguladores potenciais de angiogênese, incluindo o fator de crescimento fibroblástico ácido (aFGF), fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), fator de crescimento transformante- α (TGF- α), TGF- β , fator-alfa de necrose de tumor (TNF- α), angiogenina, e interleucina-8 (IL-8). Mais recentemente, as angiopoietinas foram identificadas. Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um mitógeno endotelial célula-específico. Jaffe (2000, p. 79-81) relata uma variedade de peptídeos que induzem a angiogênese, incluindo bFGF, TGF- β , PDGF, VEGF também conhecido como fator de crescimento vascular (VPF) e as angiopoietinas 1 e 2. Em seu trabalho, descreve que apenas duas famílias de fatores de crescimento célula-específicos e os seus receptores foram identificados no ovário,

útero, e placenta: fator de crescimento endotelial (EGF), fator de permeabilidade vascular (VPF ou VEGF) e as angiopoietinas.

Vários fatores de crescimento, incluindo o aFGF e bFGF, PDGF, VEGF estimulam o crescimento de células endoteliais vasculares *in vitro* e angiogênese *in vivo* (GORDON et al. 1995, p. 688-697).

The Angiogenesis Foundation (2003) cita os vários fatores estimuladores e inibidores conforme descriminados a seguir

Fatores de Crescimento angiogênico conhecidos

- Angiogenina
- Angiopoietina-1
- Del-1
- Fator de Crescimento Fibroblasto: ácido (aFGF) e básico (bFGF)
- Folistatina
- Fator de Crescimento estimulante de colônia-Granulócito (G-CSF)
- Fator de Crescimento Hepatócito (HGF) /scatter factors (SF)
- Interleucina-8 (IL-8)
- Leptin
- Midkine
- Fator de crescimento placentar
- Fator de crescimento endotelial derivada de plaqueta (PD-ECGF)
- Fator de crescimento derivado de plaqueta -BB (PDGF-BB)
- Pleitrophin (PTN)
- Proliferina
- Fator de crescimento transformador-alfa (TGF-alfa)
- Fator de crescimento transformador-beta (TGF-beta)
- Fator de necrose tumoral -alfa (TNF-alfa)
- Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)
- Inibidores de Angiogênese são moléculas naturais e apresentam em tecidos que param o processo angiogênico

Inibidores de Angiogênese conhecidos

- Angiostatina
- Antitrombina antiangiogênica III
- Inibidor derivado da cartilagem (CDI)
- Fragmento do complemento CD59
- Endostatina
- Fragmento de fibronectina
- Gro-beta
- Heparinases
- Fragmento de Heparina hexasacarideo
- Gonadotropina coriônica humano (hCG)
- Interferon Alfa/beta/gama
- Interleucina-12
- Kringle 5 (fragmento de plasminogênio)
- Inibidores de Metaloproteinase (TIMPs)
- 2-Methoxyestradiol
- Inibidor da ribonuclease placentar
- Plasminogênio ativador inibidor
- Fator plaquetário-4 (PF4)
- Fragmento de Prolactina 16kD
- Proteína relacionada Proliferina
- Retinóides
- Tetrahydrocortisol-S
- Trombospondina-1 (TSP-1)
- Fator de crescimento transformador- β (TGF- β)
- Vasculostatina
- Vasostatina

2.2.1 - FATOR DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO (FGF)

A família do fator de crescimento fibroblástico (FGF) consiste em dezenove FGFs distintos (COPE, 2003), mas com muitas atividades semelhantes (HYDER e STANCEL, 1999, p. 806-811). Os mais conhecidos dessa família, os dois FGFs originalmente caracterizados, o FGF básico (bFGF ou FGF1) e o FGF ácido (aFGF ou FGF2), que foram identificados através de ensaio biológico, são distribuídos amplamente no corpo. Estes não possuem uma secreção notável que permitiria a secreção dos fatores através de caminho convencional (retículo endoplasmático-complexo de Golgi) e não funcionam aparentemente como fatores livremente difusíveis, mas encontram-se em grande parte no citoplasma das células produtoras. Foi proposto que FGFs possam ser liberados de células para a matriz extracelular em consequência ao dano tecidual para participar no processo de reparo. Além disso, eles também podem agir intracelularmente, ligando-se a locais moleculares específicos (KOOS, 1993, p. 433-453).

Quando os bFGFs são “resgatados” da matriz, podem estimular o processo de diferenciação das células endoteliais (DIAS et al., 2002).

A expressão de FGF é altamente onipresente: este fator de crescimento produz mitogênese, migração e diferenciação de um grande número de células *in vitro* (HYDER e STANCEL, 1999, p. 806-811). Estes relatam também que dos vários fatores conhecidos por exibir atividade angiogênica *in vitro*, o FGF é um dos candidatos principais para regular a angiogênese *in vivo*.

Temos como exemplos da família FGFs, além dos já descritos (aFGF e bFGF), o fator de crescimento de queratinócitos (KGF) e quatro produtos oncogênicos: int-2, hst/K-FGF, FGF-5, e FGF-6, sendo o int-2 encontrado em estudo do vírus tumoral mamário em rato, onde este integrava em dois locais predominantes no genoma do rato identificados como int-1 e int-2. A proteína codificada pelo lugar de int-2 é um homólogo da família do FGF. O K-FGF é secretado pelas células de sarcoma de Kaposi (prevalente em pacientes com AIDS) (COPE, 2003).

Os quatro tipos ontogênicos da família de FGF têm sido menos estudados. Várias observações indicaram que estes fatores podem ter papéis fisiológicos importantes no animal adulto normal, mas nenhuma conexão com angiogênese fisiológica foi feita (KOOS, 1993, p. 433-453).



Com exceção de KGF, os FGFs são mitogênicos para uma extensiva gama de células mesodermas, inclusive fibroblastos, células do músculo liso e células endoteliais. KGF é mitógeno específico para célula epitelial e presumivelmente não é envolvido em angiogênese (KOOS, 1993, p. 433-453).

2.2.1.1 - Fator de Crescimento Fibroblástico básico (bFGF)

O bFGF é protótipo de uma família grande de proteínas, família designada de FGF. Seus membros exibem uma afinidade notável a heparina e são chamados também de HBGF (heparin-binding growth factor). O bFGF é uma proteína de 18 kDa com um comprimento de 155 aminoácidos. Foram descritas variantes mais curtas com um comprimento de 131 e 146 aminoácidos. Alguns pesos moleculares mais altos da forma de bFGF (22-25 kDa) também foram descritos. A menor forma de bFGF (18 kDa) acontece predominantemente no citosol, enquanto o peso molecular mais alto (22-25 kDa) é associado com o núcleo e ribossomos. As seqüências de bFGF-bovino e humano diferem em apenas dois aminoácidos. Os bFGF humano e ovino são idênticos. O caminho de secreção também não é clássico (retículo endoplasmático-complexo de Golgi). O mecanismo que está relacionado à liberação de bFGF é desconhecido (COPE, 2003).

O primeiro fator de crescimento purificado encontrado para aumentar a proliferação, migração e diferenciação de células endoteliais, de músculo liso e fibroblastos foi de fato o bFGF (HYDER e STANCEL, 1999, p. 806-811).

Estudos sugerem que o bFGF estimula mitoses nas células vasculares endoteliais através de um mecanismo que envolve a formação intracelular de ácido aracdônico e a formação de eicosanóides. Embora o bFGF não possua especificidade para o endotélio, atua efetivamente no crescimento endotelial *in vitro* e é capaz de induzir, em nanogramas, a angiogênese *in vivo* (DIAS et al., 2002).

Hyder e Stancel (1999, p. 806-811) relataram que as ações angiogênicas *in vivo* de bFGF podem ser iniciadas pela liberação de sulfato de heparam das membranas celulares ou matrizes extracelulares ou através da produção aumentada, liberada pelas células.

O bFGF estimula o crescimento de fibroblastos, mioblastos, osteoblastos, células neurais, células endoteliais, queratinócitos, condrócitos e muitos outros tipos de células.



Em células endoteliais capilares, o bFGF age de uma maneira autócrina. A ação mitogênica de bFGF para as células endoteliais pode ser potencializada através da trombina (COPE, 2003).

O bFGF foi mostrado ser um promotor ou modulador inibitório da diferenciação celular também para outros tipos celulares. O bFGF não só é um mitógeno para condrócitos, mas também inibe a diferenciação terminal deles. Em bFGF de embriões, funciona como um fator de diferenciação que induz tecidos destinados para produzirem estruturas ectodérmicas para diferenciarem-se em tecidos mesodérmicos. A influência de bFGF em processos de diferenciação provavelmente é o resultado de uma interação complexa com outros fatores. São observados níveis elevados de bFGF durante o desenvolvimento embrionário e foi sugerido que bFGF, em combinações com outros fatores com atividade semelhantes, por exemplo, TGF- β , pode estar envolvido no desenvolvimento do mesoderma (COPE, 2003).

O bFGF também age como um hormônio ovariano e diferentemente regula a expressão de esteróides. O bFGF modula a proliferação e diferenciação de células da granulosa e inibe a indução de receptores para hormônios luteinizantes mediado por FSH. O bFGF também bloqueia a síntese de enzimas a qual é induzida por FSH. O bFGF estimula a síntese de progesterona. Alguns destes efeitos de bFGF, em troca, são bloqueados através de TGF- β , enquanto é sugerido que a relação de bFGF/TGF- β é usada para o controle de processos (COPE, 2003).

Na angiogênese, o bFGF controla a proliferação e migração de células endoteliais vasculares. A expressão de ativador de plasminogênio e atividade de collagenase por estas células são aumentadas através de bFGF. O bFGF é provavelmente um dos fatores responsáveis pelo crescimento de novos vasos sangüíneos que colonizam o mesencéfalo e telencéfalo que neste momento está essencialmente livre de vasos sangüíneos (COPE, 2003).

O bFGF também possui um importante papel fisiológico em regeneração tecidual e cura de feridas (cicatrização). Os anticorpos monoclonais dirigidos contra bFGF inibem o crescimento de células tumorais. Em células endoteliais do bFGF reduz a expressão do receptor para TGF- β , modulando efetivamente assim a ação inibidora de TGF- β em células endoteliais. A atividade de bFGF em epitélio vascular é fortemente inibida através de TGF- β . Porém, TGF- β também pode ter ações positivas em processos bFGF-mediados em outros tipos de células (COPE, 2003).



2.2.1.2 - Fator de Crescimento Fibroblástico ácido (aFGF)

O aFGF é produzido por um espectro semelhante de células mesodérmicas e origem neuroectodermal que também produzem bFGF. Os aFGF são proteínas de 16 kDa e 140 aminoácidos, das quais foram também descritas variantes com um comprimento de 134 e 155 aminoácidos. O aFGF bovino e humano só se diferenciam um do outro através de 11 trocas de aminoácidos (COPE, 2003).

2.2.2 - FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF)

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é uma citocina multifuncional que foi identificada originalmente como uma proteína produzida por células tumorais que aumenta a permeabilidade de vasos capilares a proteínas e também a proliferação entre as células endoteliais, onde ganhou a denominação de fator de permeabilidade vascular (KOOS, 1993, p. 433-453). Atualmente, o VEGF é considerado um fator preponderante na formação de vasos, tanto no período de vasculogênese como no de angiogênese (DIAS et al., 2002). Segundo COPE (2003), o VEGF é definido como uma proteína homodimérica glicosilada de 46-48 kDa. Porém, a glicosilação não é requerida para atividades biológicas. Este fator é chamado VPF, VEGF ou vasculotropina na literatura. VEGF é expresso em células epiteliais e mesenquimais em uma ampla variedade de tecidos, e é altamente expresso em muitos tumores (HYDER e STANCEL, 1999, p. 806-811).

Os VEGFs também são expressos em uma gama extensiva de tecidos e órgãos nos quais a angiogênese não acontece, incluindo hipófise, cérebro, rim, pulmão, glândula adrenal, coração, mucosa estomacal, fígado e baço. A ocorrência difundida de VEGF sugere que suas ações não sejam limitadas a crescimento de novos vasos sanguíneos (KOOS, 1993, p. 433-453).

Até recentemente, o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) era considerado o único fator específico para a formação de vasos sanguíneos. De acordo com Dias et al. (2002), existem 5 membros da família VEGF: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E ou PLGF (fator de crescimento plaquetário).

Correspondendo à expressão de VEGF, os receptores de VEGF foram achados VEGF-R1 e VEGF-R2 (ou VEGFR-1 e VEGFR-2), os quais são expressos em níveis



mais altos durante a fase de crescimento do corpo lúteo (GOEDE et al., 1998, p. 1385-1394).

O receptor VEGFR-2 parece mediar a maior parte das respostas angiogênicas, inicialização, alongamento e permeabilidade de vasos sanguíneos do VEGF-A, enquanto o VEGFR-1 exerceria apenas uma função moduladora no processo, principalmente seqüestrando o sinal ligante (VEGF), sem efetivar uma resposta positiva na vascularização (DIAS et al., 2002).

Durante o processo de remodelagem vascular, o destino dos vasos depende fundamentalmente da disponibilidade de VEGF. Na presença desse fator, os vasos iniciam processo de crescimento, recapitulando a atividade angiogênica em taxa similar à do desenvolvimento embrionário, enquanto na ausência de VEGF, as células, destituídas de adesão, entram em apoptose e os vasos conseqüentemente regredem (DIAS et al., 2002).

2.2.3 - FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMANTE - β (TGF- β)

Três formas de fator de crescimento transformante- β (TGF- β) (1, 2 e 3) foram identificadas em mamíferos. Eles são polipeptídeos secretados de forma oculta e acredita-se que são ativados através de protease. Possuem vários processos importantes, inclusive no tratamento de feridas. Com respeito a crescimento de células, seus efeitos são principalmente inibitórios, onde TGF β -1 inibe a proliferação e migração de células endoteliais *in vitro*, mas é angiogênico *in vivo*. São produzidos TGF β -1 e TGF β -2 no ovário. Células da granulosa humanas parecem expressar ambas as formas, considerando que as do rato e hamster parecem produzir só TGF β -2. Porém, ambas as formas são encontradas em compartimentos da teca/interstício destas espécies. Não há dado que mostre TGFs no ovário com angiogênese, mas TGF β -1 foi comprovado recentemente ser um possível mediador do efeito proliferativo do estrogênio em células da granulosa. Estrogênio estimula a produção de um TGF- β através de células ovarianas (KOOS, 1993, p. 433-453).

O TGF β , angiogenina, fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina 1 induzem angiogênese *in vivo*, mas com pequeno ou nenhum efeito na proliferação de células endoteliais. É provável que estes fatores induzem indiretamente a angiogênese causando inflamação ou induzindo a produção de fatores angiogênicos diretos (KOOS,



1993, p. 433-453).

2.2.4 - FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA (IGF)

O fator de crescimento semelhante à insulina, conhecido também como insulina como fator de crescimento (IGFs) é uma família de fatores de crescimento relacionada em estrutura à insulina e que tem papéis importantes no crescimento de tecidos mesenquimais. Trabalhos recentes indicaram que IGFs não têm efeito mitogênico apreciável em células endoteliais, embora tenha alta afinidade aos receptores. Porém, mais recentemente, foram relatados que IGFs estimulam a síntese de DNA em células endoteliais em capilares da retina bovina. Em outro trabalho, um efeito mitogênico de IGF em células endoteliais foi visto, mas só na presença de heparina. No ovário, IGFs têm importante papel no crescimento e diferenciação de células. São encontrados em fluido folicular humano, originando-se do sangue e das células da granulosa. É possível que o IGF facilite o processo angiogênico porque enzimas proteolíticas e heparina-ligante glicosaminoglicanas, que liberam proteínas que se ligam ao IGFs, são produzidos através de células da granulosa junto com o desenvolvimento folicular, ovulação e, provavelmente, formação de corpo lúteo. IGFs podem também ter sinergismo com outros fatores para causar proliferação de células endoteliais (KOOS, 1993, p. 433-453).

2.2.5 - FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL ou EPIDÉRMICO (EGF) e FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMANTE- α (TGF- α)

Fator de crescimento epidérmico (EGF) é um polipeptídeo e o primeiro fator a ser purificado e testado para a atividade angiogênica. Foi descoberto em ovário humano e em tecido tecal e intersticial de rato. Possui papel importante na diferenciação de células epiteliais. Foi identificado em estudo para induzir uma resposta angiogênica positiva na córnea de coelho, embora este efeito pudesse ser secundário à proliferação de células epiteliais na córnea (KOOS, 1993, p. 433-453).

Foi provado que o EGF possui pequeno ou nenhum efeito mitogênico direto em



células endoteliais; porém, recentes estudos indicam que o EGF é mitogênico para células endoteliais em certas condições, por exemplo, quando FGFs também estão presentes (KOOS, 1993, p. 433-453).

Apesar de Jaffe (2000, p. 79-81) citar o EGF como fator de crescimento encontrado nos órgãos reprodutivos, Davis et al. (1996, p. 1351-1380) relatam que EGF não é mitogênico no corpo lúteo de bovinos, apesar da presença de seus receptores.

O Fator de crescimento transformante α (TGF- α) é um polipeptídeo de cadeia única estruturalmente relacionado ao EGF. Foi isolado em células viróticamente modificadas com resultado oncogênico. TGF- α e EGF interagem com um tipo de receptor comum e os efeitos biológicos e potência das duas moléculas *in vivo* e *in vitro* são geralmente semelhantes. O TGF- α pode estar envolvido na angiogênese durante o desenvolvimento fetal e em uma variedade de tumores sólidos. Em um estudo, o TGF- α induziu uma resposta angiogênica na bochecha de hamster onde se apresentou mais potente que o EGF. Porém, ambos os fatores de crescimento tiveram efeitos semelhantes em proliferação de células endoteliais *in vitro* (KOOS, 1993, p. 433-453).

2.2.6 - FATOR DE NECROSE TUMORAL- α (TNF- α)

O fator de necrose tumoral foi encontrado originalmente no soro de rato, depois de uma injeção intravenosa de endotoxina bacteriana preparada por *Micobacterium bovis*. O TNF está presente também em soro de ratos, coelhos e porcos. O TNF contido em soro de ratos é citotóxico ou citoestático. Causa necrose de tumores transplantados em ratos. Os dois tipos de TNF são conhecidos como TNF- α e TNF- β . Em muitos artigos, nenhuma distinção é feita entre TNF- α e TNF- β . Na maioria dos casos o termo TNF só recorre a TNF- α , enquanto TNF- β normalmente é conhecido como linfotoxina (LT). Um nome alternativo pode ser TNF/linfotoxina (COPE, 2003).

O fator de necrose tumoral- α (TNF- α) é uma citocina de cadeia única produzido por macrófagos e algumas células tumorais. É um mediador multifuncional de inflamação e imunidade. Seu nome origina de seus efeitos citoestáticos e citocidas em muitas células neoplásicas (KOOS, 1993, p. 433-453).

O TNF- α inibe a proliferação de células endoteliais *in vitro*. *In vivo*, estimula a angiogênese, talvez como consequência da excitação de infiltração de leucócitos. Então,

é possível que o TNF- α tenha um papel indireto no aumento da angiogênese durante as reações inflamatórias. Um recente estudo indica que o efeito de TNF- α é dose dependente. Baixas doses infundidas na córnea induziram angiogênese, considerando que doses altas eram inibitórias (KOOS, 1993, p. 433-453).

Além de TNF- α , várias outras citocinas têm efeitos em células endoteliais, inclusive interleucinas-1, interleucinas-6, interferon- γ e interferon- α . Semelhante a TNF- α , interleucina 1 estimula a angiogênese na córnea de coelho, mas é inibidor potente da proliferação de células endoteliais e formação de capilares *in vitro*. Interferon- γ e o interferon- α aumentam a formação de capilares através de células endoteliais (KOOS, 1993, p. 433-453).

2.2.7- PROSTAGLANDINAS E OUTROS LIPÍDIOS

Foram encontrados prostaglandinas E1 e E2 que estimulam angiogênese *in vivo*. Os inibidores de síntese de prostaglandinas parecem retardar a angiogênese. O mecanismo de ação da prostaglandina em angiogênese é desconhecido. É bem estabelecido que prostaglandinas, inclusive E2, são produzidas pelo folículo e a produção é grandemente estimulada pelo LH pré-ovulatório. Entretanto, as prostaglandinas possuem um papel importante no crescimento vascular que acontece na ovulação seguinte. Em um recente estudo, foi encontrado lipídio em células da granulosa de rato como substâncias que estimularam a proliferação e a migração de células endoteliais, mas a atividade não parecia estar relacionada com a prostaglandina. Recentemente foram identificados vários lipídeos diferentes como tendo atividade angiogênica, mas se eles têm papel direto no processo contínuo da angiogênese, isso não foi demonstrado (KOOS, 1993, p. 433-453).

2.2.8 - ANGIOGENINA E FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE PLAQUETAS

Dois outros fatores que demonstraram atividade angiogênica são angiogenina e fator de crescimento derivado de plaquetas (PD-ECGF). De forma interessante, os fatores têm atividade enzimática. Como estes estão relacionados à atividade angiogênica é desconhecido. Não foi provado estarem especificamente no ovário, embora o PD-

ECGF estivesse presente em plaquetas no sangue e teoricamente poderia ser liberado no ovário se fossem ativadas as plaquetas, o que é bastante possível na hora da ovulação e formação do corpo lúteo (KOOS, 1993, p. 433-453).

2.3 - ANGIOGÊNESE OVARIANA

Os órgãos reprodutores femininos são marcados por crescimento periódico e regressão, acompanhadas por mudanças notáveis nas taxas do fluxo sanguíneo (REYNALDS et al. 1992, p. 886-892). Então, não é surpreendente que eles sejam alguns dos poucos tecidos no adulto nos quais a angiogênese acontece como um processo normal (REDMER e REYNALDS, 1996, p. 182-192).

No início do século passado, vários pesquisadores observaram a intensa vascularização dos folículos ovarianos e do corpo lúteo e a reconheceram como um importante suporte para o crescimento e desenvolvimento daqueles tecidos (CLARK, 1900, p. 593-676; ANDERSEN, 1926, p. 107-123; BASSETT, 1943, p. 251-291). Em um estudo do ovário humano desde o estágio fetal até a senescência, Clark (1900, p. 593-676) concluiu que “impulso vital para o crescimento na teca interna depende não da manutenção de seu suprimento sanguíneo primitivo, mas de um intenso aumento do suprimento”. Mais recentemente, estudos confirmaram que folículos dominantes possuem uma teca mais vascularizada e absorvem mais gonadotrofinas séricas do que outros folículos, portanto o aumento na vascularização pode ser o principal determinante da dominância folicular (MCNATTY et al. 1981, p. 99-109; ZELEZNIK et al. 1981, p. 356-361).

A foliculogênese é um processo dinâmico caracterizado por uma acentuada proliferação e diferenciação das células somáticas que compõem o folículo. O folículo em desenvolvimento proporciona um ambiente ótimo para a maturação do oócito e sua subsequente fertilização após a ovulação (ARMASTRONG e WEBB, 1997, p.139-146).

No ovário, os folículos primordiais aparecem em maior número, porém são os menos desenvolvidos, localizam-se logo abaixo da túnica albugínea, são constituídos por um oócito primário envolto por uma camada única de células foliculares escamosas. O folículo primário começa a aumentar de tamanho, as células que o rodeiam mudam da forma plana para a cúbica e produzem uma substância acelular composta por mucopolissacarídeos que se deposita sobre a superfície do oócito, formando a zona

pelúcida, uma membrana translúcida e acidófila que envolve o oócito. A proliferação das células foliculares leva à formação de um folículo multilaminar, onde os espaços entre as células começam a ser preenchidos por líquido e formam o antro folicular. O crescimento continuado leva à formação do folículo secundário com um antro na forma de um C e onde as células foliculares são chamadas de membrana granulosa. A teca folicular, uma bainha de células do estroma, forma-se em volta do folículo. Esta teca diferencia-se em teca interna e teca externa. A teca interna é celular e vascularizada, enquanto a teca externa é uma camada externa de tecido conjuntivo. Os limites entre o estroma e a teca externa e entre as duas tecas não são sempre distintos. O crescimento contínuo resulta na formação de um grande folículo terciário ou de Graaf, em que o oócito (Figura 3) está envolto por várias camadas da membrana granulosa (BACHA & WOOD, 1990, p. 269).

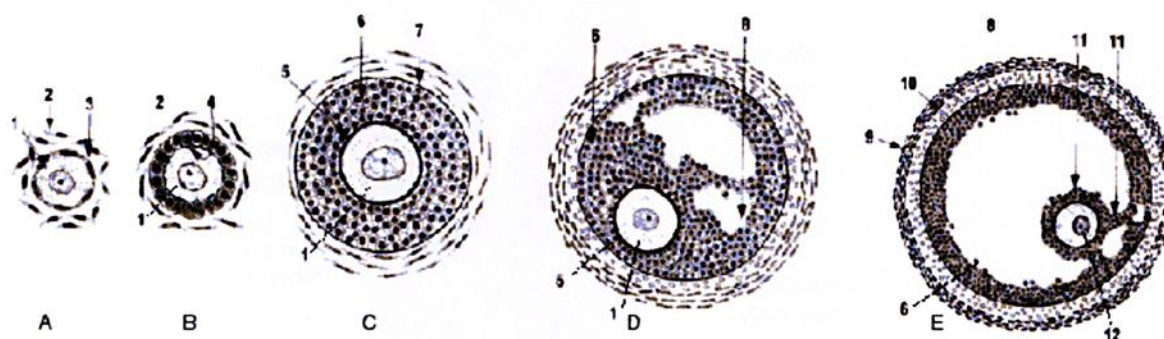


FIGURA 3 - Folículos ovarianos em diferentes fases de desenvolvimento.

A - Folículo primordial; B - Folículo primário; C, D - Folículos secundários (ou em crescimento); E - Folículo terciário (ou de Graaf). 1. oócito primário; 2. tecido conjuntivo do ovário; 3. células foliculares achatadas; 4. células foliculares cúbicas; 5. membrana pelúcida; 6. granulosa; 7. envoltório externo do folículo ou teca; 8. antro folicular; 9. teca externa; 10. teca interna; 11. células do *cumulus oophorus*; 12. oócito secundário

No ovário ocorre alteração vascular de forma cíclica (FINDLAY, 1986, p. 357-366). No desenvolvimento do suprimento vascular de folículos verificou-se que o folículo primordial não possui uma rede capilar independente e recebe nutrientes e hormônios vindos de vasos do estroma. O folículo primário desenvolve um suprimento vascular inicial que consiste de uma ou duas arteríolas que terminam em uma rede com a forma de uma coroa, na medida em que o folículo cresce e forma o antro folicular (SLADKEVICIUS e CAMPBELL, 2000, p. 691-703). Esta coroa vascular na teca

interna (Figura 6) torna-se achatada contra a membrana basal que, por sua vez, separa a teca interna que possui vascularização crescente da camada avascular de células granulosa (CLARK, 1900, p. 593-676). No momento da ovulação, a membrana basal que separa a teca folicular (ricamente vascularizada) da camada de células da granulosa (dentro do folículo e avascularizada) degenera, o oócito é expelido, e a seguir ocorre à invasão do folículo por capilares, com intenso crescimento, provenientes da teca interna. Esta rápida invasão de capilares completa-se no terceiro dia após a ovulação (Figura 5) (CORNER, 1956, p. 377-401). O desenvolvimento vascular do folículo ovariano torna-se mais acentuado após a ovulação, associado com o desenvolvimento do corpo lúteo (CLARK, 1900, p. 593-676; BASSET, 1943, p. 251-291)

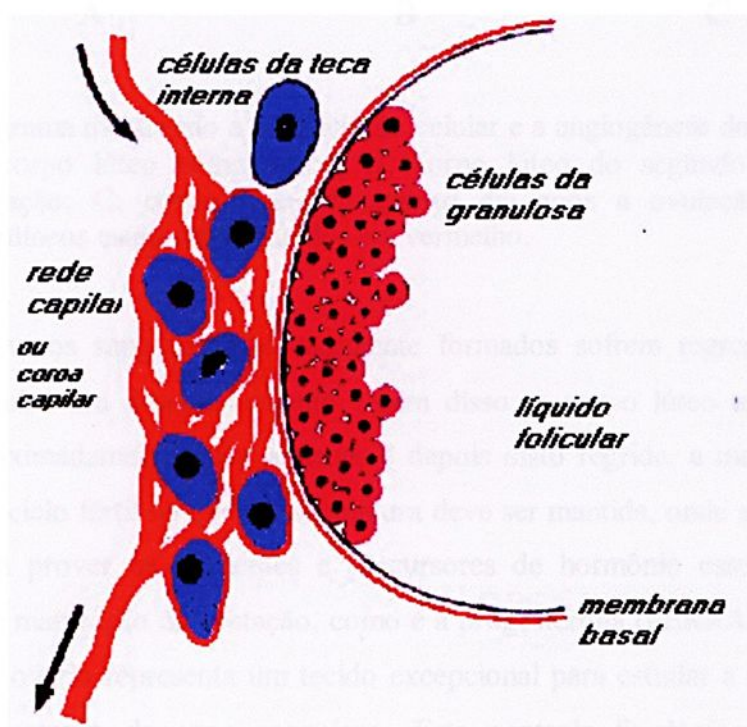


FIGURA 4 - Esquema da rede capilar da teca interna e da camada avascular da camada das células da granulosa

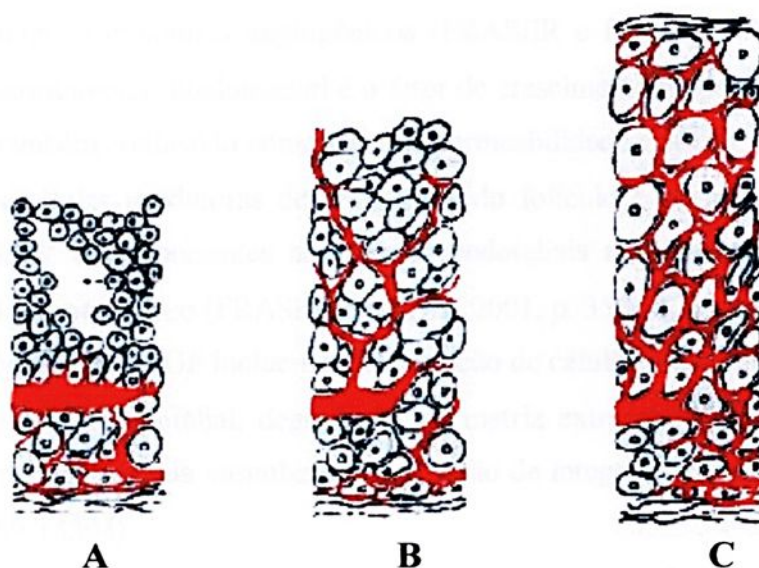


FIGURA 5 - Diagrama mostrando a organização celular e a angiogênese do corpo lúteo. A, corpo lúteo hemorrágico; B, corpo lúteo do segundo dia após a ovulação; C, corpo lúteo do quarto dia após a ovulação. Os vasos sanguíneos estão representados em vermelho.

Ainda estes vasos sanguíneos recentemente formados sofrem regressão como a maioria dos folículos em desenvolvimento. Além disso, o corpo lúteo tem uma vida funcional de aproximadamente duas semanas e depois disto regride, a menos que seja salvo durante um ciclo fértil no qual a vasculatura deve ser mantida, onde a angiogênese é necessária para prover os nutrientes e precursores de hormônio essencial para o estabelecimento e maturação da gestação, como é a progesterona (FERRARA, 2000, p. 15-35). Assim, o ovário representa um tecido excepcional para estudar a regulação do crescimento e regressão do vaso sanguíneo. Este controle fisiológico contrasta à situação no caso de tumores e anormalidades angiogênicas, como aumento dos inibidores ou estimuladores da angiogênese (FRASER & LUNN, 2000, p. 787-797).

Foi relatado que os folículos ovarianos e os corpos lúteos contêm e produzem fatores angiogênicos. Estes fatores angiogênicos parecem ser heparina-ligante e pertencem ao fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento transformante (TGF) (SMITH, 2001, p. 777-783). Além disso, fatores que regulam a abertura da comunicação juncional podem ter um papel importante, coordenando as interações entre vascularização luteal e o tecido avascular (REDMER e REYNALDS, 1996, p. 182-192).

A angiogênese é regulada na área reprodutiva e em outra área por pelo menos 20

fatores de crescimento e inibidores angiogênicos (FRASER e LUNN, 2000, p. 787-797). Um fator de crescimento fundamental é o fator de crescimento de permeabilidade vascular (VEGF), também conhecido como fator de permeabilidade vascular (VPF), que é sintetizado pelas células produtoras de hormônios do folículo e corpo lúteo. Seus receptores Flt e KDR estão presentes nas células endoteliais na teca, estendendo a camadas do folículo e corpo lúteo (FRASER e LUNN, 2001, p. 355-362).

As ações biológicas de VEGF incluem a proliferação de célula endotelial, migração e diferenciação de célula endotelial, degradação da matriz extracelular, formação de tubo, aumento de permeabilidade vascular e manutenção de integridade vascular (CAO et al. 1998, p. 14389-14394).

No folículo, a camada de células da granulosa representa uma fonte principal do fator angiogênico, secretando o VEGF que tende a se acumular no antro folicular, onde cria um gradiente angiogênico que regula o desenvolvimento da rede capilar e sua arquitetura dentro da parede do folículo (SLADKEVICIUS e CAMPBELL, 2000, p. 691-703).

O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é expresso, após estímulo pela hipóxia e aumento de mRNA para sua síntese, pelas células da granulosa de folículos com antros pequenos, nos pré-ovulatórios e em corpos lúteos, e atua como potente regulador parácrino na formação da rede vascular folicular e luteal (KOOS, 1993, p. 433-453).

Tratamento com inibidores de VEGF resulta em uma diminuição na proliferação de célula da granulosa. Inibição de VEGF durante o início e metade da fase luteal resulta numa supressão marcada na angiogênese no CL, fracasso no desenvolvimento microvascular e uma inibição da função do corpo lúteo como diminuição da concentração de progesterona (FRASER e LUNN, 2001, p. 355-362).

Ferrara et al. (1998, p. 337-340) relatam que o VEGF é um mitógeno específico para células endoteliais derivadas de artérias, veias e linfáticos, onde, diferentemente do bFGF que é livremente difusível, possui um importante papel na regulação da angiogênese fisiológica e patológica como exemplo, o VEGF é essencial para a angiogênese do corpo lúteo, onde aumenta a permeabilidade vascular. Além disso, em casos patológicos o VEGF tem implicações no controle de fertilidade e no tratamento de distúrbios ovarianos caracterizados por hipervascularização e hiperplasia.

Segundo Hyder e Stancel (1999, p. 806-811), o sinal de VEGF mais forte foi obtido em corpo lúteo. De forma interessante, o corpo lúteo jovem e maduro contiveram

quantias semelhantes de VEGF, embora a taxa de angiogênese não fosse muito diferente. Já no corpo lúteo em seu estágio final e em tecidos não reprodutivos como coração e cérebro, verificou-se que as funções não são limitadas ao processo relativamente raro de angiogênese. Eles também podem ser essenciais para a manutenção da integridade vascular ou na modulação de permeabilidade vascular. Um aumento induzido de VEGF em permeabilidade vascular poderia estar envolvido no acúmulo de fluido folicular e no processo ovulatório (KOOS, 1993, p. 433-453).

Davis et al. (1996, p. 1351-1380) citam em seu trabalho que o PDGF é o principal mitógeno para células da teca do folículo ovariano, embora atue em conjunto com outros fatores de crescimento para produzir efeitos mitogênicos em células da granulosa.

Apesar do fato de que angiogêneses acontecem durante o crescimento folicular como também durante a formação de corpo lúteo, folículos transplantados não induziram uma resposta angiogênica. (KOOS, 1993, p. 433-453).

Armastrong e Webb (1997, p. 139-146) descrevem em seu trabalho alguns fatores que controlam a ação ovariana como, por exemplo, o IGF, TGF- β , FGF e EGF/TGF- α , onde relatam que o ovário é o local principal de produção do IGF em espécies mamíferas e não mamíferas. IGFs funcionam como moduladores de ação das gonadotrofinas a nível celular e estimulam a proliferação das células da teca e da granulosa e a diferenciação. O TGF- β em vacas, inibe a proliferação das células da granulosa e das células da teca, enquanto aumenta a esteroidogênese, estimulada por gonadotrofinas. Em geral, estes dados indicam que o TGF- β é um regulador local de funções ovarianas. Em contraste com IGF, TGF- β é liberado pelas células de forma oculta que não se liga aos receptores de alta afinidade de TGF- β , sendo que um passo importante na atividade de regulação de TGF- β está na sua conversão na forma ativa.

Dentro do ovário, o membro mais estudado da família dos FGFs é o FGF-2. A produção deste fator de crescimento foi demonstrada em células da granulosa bovina, onde foi mostrado que o FGF-2 ou FGF-básico estimulava a proliferação das células tecais bovinas. Os FGFs são fatores de crescimento potentes, em virtude da sua estimulação promover a proliferação de células endoteliais. Porém, a regulação precisa da angiogênese ovariana permanece incerta (ARMASTRONG e WEBB, 1997, p. 139-146).



3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A angiogênese é um complexo processo de desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir de capilares preexistentes e ocorre em resposta a um estímulo, como o trauma ou hipóxia tecidual. O mecanismo da angiogênese engloba pelos menos 10 etapas consecutivas e reguladas por fatores estimuladores e inibidores. Até o momento foram descobertos 20 estimuladores e 27 inibidores que atuam no mecanismo da angiogênese de forma simultânea ou em seqüência na inibição, no crescimento e diferenciação dos novos vasos sanguíneos. Nos órgãos reprodutivos feminino, a angiogênese ocorre de forma cíclica. O ovário constitui-se em um modelo para o estudo da angiogênese que inicia-se durante o desenvolvimento folicular e termina na formação do corpo lúteo. O encontro de fatores de crescimento específico e expresso por células do ovário têm auxiliado o entendimento de quais e como agem tais fatores no mecanismo da angiogênese ovariana, como exemplo, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que é expresso, após estímulo pela hipóxia e aumento de mRNA para sua síntese, pelas células da granulosa de folículos com antros pequenos, nos folículos pré-ovulatórios e em corpos lúteos e atua como potente regulador parácrino na formação da rede vascular folicular e luteal.

Apesar da descoberta de vários fatores inibidores e estimuladores do mecanismo angiogênico e da expressão do VEGF pelas células da granulosa, até o momento não foi detectado fatores específicos para a angiogênese ovariana.

4 - REFERÊNCIAS

ANDERSEN, D.H. Lymphatics and blood vessels of the ovary of the sow. **Contributions to Embryology**, Washington, n. 17, p. 107-123, 1926.

ANGIOTECH. **What is angiogenesis?**. Disponível em: <http://med.chungbuk.ac.kr/~gbjeong/reseach.html>. Acesso em: 02 jun.2003.

ARMASTRONG, D. G. e WEBB, R. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. **Reviews of Reproduction**, Cambridge, n. 2, p. 139-146, 1997.

BACHA JR, W. J. e WOOD, L.M. **Color atlas of veterinary histology**. Lea & Febiger, Philadelphia, p. 269, 1990.

BASSETT, D.L. The changes in the vascular pattern of the ovary of the albino rat during the estrous cycle. **American Journal of Anatomy**, Philadelphia, n. 73, p. 251-291, 1943.

CAO et al. Vascular endothelial growth factor C induces angiogenesis in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v. 95, n. 24, p. 14389-14394, 1998.

CLARK, J.G. The origin, development and degeneration of the blood vessels of the human ovary. **Johns Hopkins Hospital Report**, Baltimore, n. 9, p. 593-676, 1900.

COPE: **Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia**. Disponível em: <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi>. Acesso em: 10 jan. 2003.

CORNER, G. J. The histological dating of the human corpus luteum. **American Journal Anatomy**, Philadelphia, n. 98, p. 377-401, 1956.



DAVIS, J. S. et al. Mechanisms of hormone and growth factor action in the bovine corpus luteum. **Theriogenology**, Stonehan, v. 45, p. 1351-1380, 1996.

DIAS et al., **Novos Moduladores da formação de vasos sangüíneos**. Disponível em: <http://www.biotechnologia.com.br/bio/bio25/5.htm>. Acesso em: 12 jul. 2002.

DVORAK, H.F. VPF/VEGF and the Angiogenic Response. **Seminars in Perinatology**, Boston, v. 24, n. 1, p. 75-78, 2000.

FERRARA, N. et al. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. **Nature Medicine**, New York, v. 4, n. 3, p. 337-340, 1998.

FERRARA, N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. **Kidney International**, San Francisco, v. 56, n. 3, p. 794-814, 1999.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. **Recent progress in hormone research**, San Diego, v. 55, p. 15-35, 2000.

FINDLAY, J.K. Angiogenesis in reproductive tissues. **Journal Endocrinology**, Bristol, n. 111, p. 357-366, 1986.

FRASER, H.M. & LUNN, S. F. Angiogenesis and its control in the female reproductive system. **British Medical Bulletin**, v. 56, n. 3, p.787-797, 2000.

FRASER, H.M. e LUNN, S.F. Regulation and manipulation of angiogenesis in the ovary. **Reproduction**, Edinburgh, n. 121, p. 355-362, 2001.

GEVA, E. e JAFFE, R. B. Role of angiopoietins in reproductive tract angiogenesis. **Obstetrical and Gynecological Survey**, San Francisco, v. 55, n. 8, p. 511-19, 2000.

GOEDE, V. et al. Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. **Laboratory Investigation**, Göttingen, v. 78, n. 11, p. 1385-1394, 1998.

GORDON, J. D. et al. Angiogenesis in the human female reproductive tract. **Obstetrical Gynecological Survery**, San Francisco, v. 50, n. 9, p. 688-697, 1995.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. 6.ed., São Paulo: Manole, 1995. 582p.



HYDER, S.M. e STANCEL, G.M. Regulation of angiogenic growth factor in the female reproductive tract by estrogens and progestins. **Molecular Endocrinology**, Texas, v.13, n.6, p. 806-811, 1999.

JAFFE, R.B. Importance of angiogenesis in reproductive physiology. **Seminars Perinatology**, San Francisco, v. 24, n. 1, p. 79-81, 2000.

KOOS, R.D. **The ovary**. New York: Raven Press, Ltd., p. 433-453, 1993.

McNATTY, K.P. et al. Accumulation of luteinizing hormone, oestradiol and androstenedione by sheep ovarian follicles in vivo. **Journal of Endocrinology**, Bristol, n. 91, p.99-109, 1981.

PAREDES, I. F., **La angiogenesis en la salud y en la enfermedad**. Disponível em: <http://www.ciencias.uma.es/publicaciones/encuentros/ENCUENTROS38/angiogenesis.html>. Acesso em: 12 jul. 2002.

REDMER, D.A. e REYNALDS, L.P. Angiogenesis in the ovary. **Reviews of Reproduction**, Fargo, v.1, n. 3, p. 182-192, 1996.

REYNALDS L. P. et al. Angiogenesis in the female reproductive system. **The FASEB Journal**, Bethesda, n. 6, p. 886-892, 1992.

REYNALDS, L. P. et al. Angiogenesis in the corpus luteum. **Endocrine**, Fargo, v.12, n.1, p.1-9, 2000.

SLADKEVICIUS, P. e CAMPBELL, S. Advances in Ultrasound Assessment in the Establishment and Development of Pregnancy. **British Medical Bolletin**, Edinburgh, v. 56, p. 691-703, 2000.

SMITH, S.K. Angiogenesis and reproduction. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, London, v. 108, n. 8, p. 777-783, 2001.

THE ANGIOGENESIS FOUNDATION. **Understanding Angiogenesis**. Disponível em: <http://www.angio.org/understanding/understanding.html>. Acesso em: 13 Abr.2003.

ZELEZNIK A.J. et al. 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**, Baltimore, n. 109, p. 356-361, 1981.

