

PRINCIPAIS MARCADORES DE ANGIOGÊNESE EM TUMORES DE MAMA: REVISÃO NARRATIVA

PRINCIPAL MARKERS OF ANGIOGENESIS IN BREAST TUMORS: A NARRATIVE REVIEW

Autores

Gabriela Rodrigues da Cunha Borges¹

Gabriela Marajó De Toni¹

Vaniana Harmad Char¹

Maria Eduarda Camargo Sandrini¹

George Kemil Abdalla²

Resumo

A formação de uma rede vascular associada ao tumor é um passo importante para compreender as etapas da progressão tumoral. Esta revisão tem como objetivo destacar os principais marcadores de indução, proliferação e inibição da angiogênese, bem como a quantificação da densidade microvascular, correlacionados com pesquisas pré-clínicas e clínicas em cânceres ginecológicos. Estudos mostram que nos casos mais avançados de cânceres ginecológicos, biomarcadores como VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular), MMP (Metaloproteinase de Matriz), CD105 (Endoglinta), TIMP (inibidores de tecido de metaloproteinases) e VASH (Vasohibina) estão mais expressos em comparação com indivíduos saudáveis. A avaliação contínua desses biomarcadores em casos de câncer poderia servir no futuro como base para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, levando a uma boa resposta ao tratamento do câncer e, assim, aumentando a sobrevivência dos pacientes com câncer.

Palavras-chave: Angiogênese, biomarcadores, Endoglinta, câncer ginecológico, densidade microvascular, VEGF.

Filiação

¹ Curso de Medicina, Universidade de Uberaba, Uberaba, Minas Gerais, Brasil

² Disciplina de Anatomia Humana, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brasil

Abstract

The formation of a vascular network associated with the tumor is an important step in understanding the stages of tumor progression. This review aims to highlight the main markers of angiogenesis induction, proliferation, and inhibition, as well as the quantification of microvascular density, correlated with pre-clinical and clinical research in gynecological cancers. Studies show that in advanced cases of gynecological cancers, biomarkers such as VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), MMP (Matrix Metalloproteinase), CD105 (Endoglin), TIMP (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases), and VASH (Vasohibin) are more expressed compared to healthy individuals. The ongoing assessment of these biomarkers in cancer cases could potentially serve as a foundation for the development of new therapeutic approaches, leading to a favorable response to cancer treatment and thus increasing the survival of cancer patients.

Keywords: Angiogenesis, biomarkers, Endoglin, gynecological cancer, microvascular density, VEGF.

Autor Correspondente

George Kemil Abdalla
Universidade Federal do Triângulo Mineiro
E-mail: gkabdalla@outlook.com

INTRODUÇÃO

O processo pelo qual as células cancerígenas surgem das células normais é chamado tumorigênese e ocorre em várias etapas. Isso inclui as mutações acumulativas que levam à ativação dos proto-oncogenes e posterior inativação dos genes supressores de tumor. A progressão e/ou regressão, assim como o futuro das células tumorais, no entanto, dependem diretamente da geração de um ambiente favorável. O chamado estroma tumoral, onde há uma relação mútua entre as células tumorais e as células residentes no estroma, como fibroblastos e células endoteliais [1].

A compreensão da formação de uma rede vascular associada ao tumor é um passo importante para entender o processo de progressão tumoral até a geração de metástases. A importância do processo de angiogênese para a progressão tumoral foi demonstrada por estudos sobre o anticorpo monoclonal contra o VEGF, o primeiro medicamento anti-angiogênico para humanos, e, portanto, há um interesse crescente no estudo da vascularização de tumores [2].

Vários marcadores celulares são usados para investigar esse processo de angiogênese em diferentes estágios da neovascularização tumoral. Esta revisão destaca os principais marcadores [3-23] para a indução da angiogênese (VEGF e MMPs), marcadores disponíveis para a proliferação endotelial e quantificação da densidade microvascular (CD105) e inibidores da angiogênese (TIMP e VASH), bem como revisa as patentes disponíveis na literatura sobre a aplicabilidade desses marcadores em pesquisas pré-clínicas e clínicas de medicamentos anti-angiogênicos em câncer ginecológico.

ANGIOGÊNESE TUMORAL

Vasculogênese e angiogênese são os termos usados para o processo de formação de novos vasos sanguíneos. O primeiro termo é o processo de formação de vasos sanguíneos durante o estágio embrionário e tem sua origem nos angioblastos. O segundo termo é o processo que ocorre durante o estágio pós-embrionário, quando a formação de novos vasos sanguíneos surge de vasos sanguíneos pré-existent [24, 25].

Em muitos processos fisiológicos, a vascularização é um passo importante, como no desenvolvimento embrionário, no ciclo menstrual feminino, nos processos de reparo tecidual, bem como no crescimento e na diferenciação de tecidos [26-28]. No entanto, em condições patológicas (doenças isquêmicas, inflamatórias e neoplásicas), esse processo é chamado de neoangiogênese [29-31].

No caso de tumores, a observação da angiogênese foi feita há mais de um século, mas a hipótese de que um tumor produz substâncias angiogênicas só foi formulada em 1968, por Folkman. Ele propôs que o crescimento do tumor e a metástase dependem da angiogênese, e que bloquear esse processo poderia ser uma estratégia para inibir a progressão tumoral [26, 32].

Diversas mutações em proto-oncogenes e genes supressores de tumor levam à produção descontrolada de fatores de crescimento, incluindo fatores angiogênicos. Por exemplo, mutações dos genes RAS e p53 aumentam a expressão do VEGF. Associado ao VEGF na indução da angiogênese, há os angiopoietinas (ANG), que apresentam duas isoformas (ANG-1 e ANG-2). No entanto, esse fator de crescimento ainda não é totalmente compreendido, pois em certas circunstâncias age como um fator pró-angiogênico, em outras atua como antagonista [33, 34]. Outro fator que não é completamente compreendido é o fator

de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), que apresenta em sua família cinco isoformas (PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC e PDGF-DD) capazes de se ligar a três receptores (PDGFR- α , PDGFR- β e PDGFR- α/β) [35]. A interação PDGF/PDGFR é importante para o crescimento celular, quimiotaxia, controle da pressão dos fluidos intersticiais e modulação do estroma tumoral, incluindo pericitos e fibroblastos (revisado por Madsen et al., 2012) [36], mas nas neoplasias ginecológicas ainda não está claro qual é a função. Por esses motivos, esses fatores não foram destacados nesta revisão.

Outros fatores que podem afetar o crescimento do tumor a partir da vascularização são as condições de permeabilidade vascular, ou seja, as metaloproteinases de matriz (MMPs), que também influenciam a infiltração de células imunes (por exemplo, monócitos, mastócitos e linfócitos), bem como agentes que promovem a produção de fatores angiogênicos, ou seja, CD105, ou inibem a proliferação de células endoteliais (TIMPs e VASH) [27, 31, 37-40].

Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)

O termo "VEGF" refere-se à glicoproteína dimérica composta por quatro isoformas VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D [6,7]. O VEGF é produzido pela maioria das células do corpo, mas é regulado positivamente pela hipóxia. Para realizar suas ações, os membros da família VEGF se ligam a três receptores de tirosina quinase, VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3. Em relação à ação no processo de neovascularização durante ensaios in vivo, o desempenho do VEGF-A está principalmente ligado à via de ativação ligada ao receptor VEGFR2 [6,7].

Associado aos receptores VEGF, há um co-receptor, a neuropilina, com duas isoformas (NRP-1 e NRP-2), que estão envolvidas na regulação celular e apresentam alta afinidade pelo VEGF, levando assim à ativação de suas vias [41,42]. Há relatos de que a NRP-1 regula as funções das células endoteliais de forma independente da relação VEGF/VEGFR2 [43,44].

O VEGF é produzido no ambiente tumoral sob hipóxia, principalmente por células endoteliais (EC) e células mieloides infiltrantes, como macrófagos associados a tumores (TAM). A angiogênese tumoral está frequentemente associada a um fenótipo imunossupressor de macrófagos, 'M2', que são pró-angiogênicos [45, 46]. Outras células infiltrantes, como neutrófilos, também podem desempenhar um papel na angiogênese tumoral [47, 48].

Considerando o papel do VEGF, vários estudos investigaram o comportamento desta glicoproteína como um biomarcador para o desenvolvimento tumoral; Está sob investigação como um marcador para a indução e progressão da angiogênese em tumores ginecológicos. Xu et al. (2013) [49] avaliaram cânceres de mama e tumores benignos de mama correlacionando a expressão do VEGF por técnicas imuno-histoquímicas e de imagem [tomografia computadorizada (TC)] para três aspectos: 1) fluxo sanguíneo, 2) volume vascular e 3) permeabilidade da superfície no local do desenvolvimento tumoral. Os resultados demonstraram que em pacientes com câncer de mama invasivo, há maior expressão de VEGF e uma correlação positiva significativa para as variáveis avaliadas pela tomografia em comparação com casos de tumores benignos de mama.

Metaloproteinases de Matriz (MMP)

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são endopeptidases com atividade proteolítica para colágeno durante a degradação de

proteínas da matriz extracelular (MEC) [8]. A família MMP inclui cerca de 28 membros, que representam uma classe importante de endopeptidases. As metaloproteinases de matriz, particularmente a MMP-2 e a MMP-9, desempenham um papel importante no desenvolvimento dos tumores, na invasão dos tumores e na formação de metástases. A ausência de equilíbrio entre as MMPs e seus inibidores pode facilitar a progressão tumoral [8].

Alguns estudos mostraram a importância de investigar as MMPs 2 e 9 em cânceres ginecológicos. Em um estudo realizado por Xu et al. (2013) [49], a expressão da MMP-2, avaliada por imuno-histoquímica, foi correlacionada com a permeabilidade vascular da superfície avaliada por tomografia computadorizada. Foi possível observar que, comparando voluntários com câncer de mama e tumores benignos de mama, os pacientes com câncer de mama apresentaram valores mais elevados para a MMP-2 e correlação positiva e significativa com o aumento da permeabilidade vascular. Outros relatos na literatura enfatizam que a expressão da MMP-2 está ligada a tumores de mama pouco diferenciados [50, 51].

Medição da Densidade Microvascular (por CD34 e CD31) e Endoglina (CD 105)

A endoglina (CD105) é uma glicoproteína de superfície celular homodimérica que atua como um receptor auxiliar para o complexo receptor do fator de crescimento beta transformante; CD34; glicoproteína de superfície celular envolvida na adesão e CD31 é uma molécula de adesão de células endoteliais de plaquetas (PECAM-1). CD105 é uma proteína, homodímero de peso molecular 180 kDa, e o gene para esta proteína está localizado no cromossomo 9; esta CD105 é expressa na superfície celular [14, 52, 53]. CD105 (Endoglina) é um marcador importante na angiogênese, pois é essencial para a proliferação das células endoteliais e estimula a fase ativa da angiogênese; a proteína (CD105) é expressa na superfície celular. Várias funções da CD105 provavelmente estão associadas às vias do TGF- β [15]. CD34 é uma glicoproteína de superfície celular envolvida na adesão, CD31 é uma molécula de adesão de células endoteliais de plaquetas (PECAM-1).

CD105, CD34 e CD31 no câncer de mama

Estudos com tumores ginecológicos usaram a marcação com CD105 e correlacionaram-na como um fator preditivo para o prognóstico, medição da densidade microvascular e avaliação de métodos terapêuticos. Nesse sentido, o estudo de Dales et al. (2003) [54] sugere que a presença de CD105 em pacientes com câncer de mama tem relevância clínica para o prognóstico. Além disso, a imunomarcagem de CD105 pode ser considerada um importante fator associado para a seleção de pacientes, o que poderia melhorar a terapia antiangiogênica, usando o mAb (anticorpo monoclonal) α -CD105. O fato de a angiogênese ser um evento importante para o crescimento tumoral e a geração de metástases implica que o nível de angiogênese [por exemplo, densidade microvascular (MVD)] também tem valor para ser avaliado como um fator prognóstico [55,56]. A extensão de novos vasos sanguíneos no câncer de mama invasivo tem uma ligação importante com a metástase para os linfonodos axilares [56-58]. Juntamente com a análise de CD105, a quantificação do MVD nos tumores pode ser feita corando o tecido com anticorpos pan-endoteliais, como CD34, CD31 e fator de von Willebrand [59]. No entanto, esses marcadores são usados quando o objetivo é distinguir vasos pré-existentes de novos vasos sanguíneos. Nesse contexto, os tumores humanos - incluindo o câncer de mama - apresentaram alta expressão de CD105 em células endoteliais de

vasos sanguíneos tumorais, mas não foram detectáveis ou coraram fracamente em vasos de tecidos normais [60,61]. Em resumo, o MVD, como avaliado usando um mAb para CD105, foi um preditor independente de prognóstico em casos de câncer de mama, mas essa avaliação não teve associação quando usado o CD34, um marcador de vasos pré-existentes. A capacidade de diferenciar quantitativamente entre a neoangiogênese tumoral e os vasos pré-existentes pode ser um procedimento chave na avaliação da vascularização tumoral [59].

Inibidores de Tecido de Metaloproteinases (TIMPs) e Vasohibina (VASH)

TIMPs

Os níveis de citocinas e fatores de crescimento regulam a expressão das MMPs e sua atividade é regulada pela ativação de pró-enzimas após sua secreção ou inibida por seu inibidor endógeno [16]. Inibidores de matriz de metaloproteinases de tecido (TIMPs) fornecem inibição na atividade das MMPs. Quatro inibidores de metaloproteinases foram caracterizados até agora, chamados de TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4. Entre esses, TIMP-1 e TIMP-2 foram mais extensivamente caracterizados, seguidos por TIMP-3 [16]. Cada TIMP possui especificidade para inibir uma determinada MMP. O TIMP-1 apresenta atividade inibitória em relação à MMP-9, mas não em todos os casos, como relatado por Leifler et al. (2013) [18], em que o TIMP-1 em células tumorais de mama foi incapaz de inibir a ação da MMP-9. Estudo realizado por Pal et al. (2014) [62] revelou na linha celular tumoral de mama (MCF-7) que a expressão de integrinas influenciou a síntese da MMP-9 e inibiu a atividade do TIMP. Assim, um desequilíbrio entre a síntese de MMPs e TIMPs está presente na progressão tumoral e no surgimento de metástases. Como relatado por Cardeal et al. (2012) [63], onde a desregulação de MMP-2 e MMP-9 e TIMP-2 estava presente em casos de carcinomas cervicais devido à influência da proteína E7 do HPV16.

No que diz respeito ao TIMP-3, ele não tem efeito inibitório sobre as MMPs, mas sobre o VEGF. O estudo de Qi et al. (2013) [17] descobriu que os peptídeos TIMP-3 são inibidores eficazes da angiogênese, bloqueando a ligação do VEGF ao receptor VEGFR2, e têm potencial para serem usados terapeuticamente em doenças com neovascularização aumentada. Embora a ação e o comportamento dos TIMPs ainda não sejam totalmente compreendidos, a literatura sugere que os TIMPs são alvos promissores para estudos angiogênicos.

VASH

As células endoteliais (CEs) podem produzir estimuladores e inibidores da angiogênese e possuem um sistema de autorregulação ou retroalimentação. Nesse sentido, foram realizados testes com análise de microarranjo de cDNA para detectar genes induzidos por VEGF nas CEs [19, 23, 64], e ensaios funcionais in vitro foram realizados para angiogênese [19], resultando no isolamento de um gene com atividade anti-angiogênica. O gene foi chamado de vasohibina (VASH), mas sua atividade anti-angiogênica in vivo ainda não foi confirmada.

Desde a descoberta dessas proteínas, a intenção de verificar seu papel no processo de vascularização estava presente. Um modelo subcutâneo de angiogênese revelou a expressão de VASH1 em CEs não proliferativas em ramificações distantes, mas não em vasos sanguíneos recém-formados de uma raiz vascular. Ao contrário do VASH1, o VASH2 é expresso prioritariamente

em células mononucleares e à frente do crescimento infiltrante [65].

Takahashi e colaboradores (2012) [66], em um estudo com SKOV-3 e DISS, duas linhagens celulares representativas de adenocarcinoma seroso humano, realizaram um knockdown do VASH2 e mostraram pouco efeito na proliferação de células cancerígenas in vitro, mas inibiram significativamente o crescimento tumoral, a disseminação peritoneal e a angiogênese tumoral em um modelo de xenotransplante murino. Indicando que o VASH2 expresso em células de carcinoma ovariano seroso promove o crescimento tumoral e a disseminação peritoneal ao promover a angiogênese. Esses estudos sugerem que o VASH seria um biomarcador clinicamente relevante com valor preditivo no prognóstico de pacientes com câncer.

DESENVOLVIMENTOS ATUAIS E FUTUROS

A angiogênese é um processo complexo que envolve uma série de fatores celulares e moleculares. Os marcadores discutidos nesta revisão desempenham papéis cruciais na indução, proliferação e inibição da angiogênese em tumores ginecológicos. A compreensão desses marcadores pode proporcionar insights valiosos sobre a progressão do câncer e direcionar estratégias terapêuticas direcionadas.

No entanto, é importante notar que a pesquisa sobre marcadores de angiogênese está em constante evolução. Novos marcadores podem ser identificados, e as compreensões atuais podem ser refinadas à medida que a ciência avança. Além disso, a aplicação clínica desses marcadores requer estudos rigorosos para validar sua utilidade como biomarcadores prognósticos ou preditivos.

Em termos de terapia, a inibição da angiogênese emergiu como uma estratégia promissora para o tratamento do câncer. Anticorpos monoclonais que visam o VEGF, como o bevacizumab, foram aprovados para uso clínico em algumas indicações. Além disso, inibidores de tirosina quinase que visam receptores de VEGF também estão sendo usados no tratamento do câncer.

No futuro, a combinação de terapias direcionadas à angiogênese com outras modalidades de tratamento, como quimioterapia e imunoterapia, pode se tornar uma abordagem padrão para muitos tipos de câncer. A personalização do tratamento com base em perfis angiogênicos do tumor também pode se tornar uma realidade, permitindo tratamentos mais eficazes e direcionados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A angiogênese desempenha um papel crucial na progressão tumoral e na formação de metástases. Os marcadores discutidos nesta revisão, incluindo VEGF, MMPs, CD105, TIMPs e VASH, são importantes componentes desse processo. A compreensão desses marcadores pode fornecer informações valiosas para a previsão do comportamento tumoral, a seleção de terapias direcionadas e o desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras.

A pesquisa contínua sobre angiogênese e seus marcadores é essencial para avançar no campo da oncologia e melhorar os resultados do tratamento para pacientes com câncer ginecológico e outros tipos de câncer. À medida que novas descobertas são feitas e novas terapias são desenvolvidas, espera-se que a

sobrevida e a qualidade de vida dos pacientes com câncer continuem melhorando.

REFERÊNCIAS

- [1] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1):57–70.
- [2] Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W. Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 333(2):328–35.
- [3] Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246(4935):1306–1309.
- [4] Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 1989; 246(4935):1309–1312.
- [5] Kim LA, D'Amore PA. A Brief History of Anti-VEGF for the Treatment of Ocular Angiogenesis. *AJP* August 2012; 181(2): 376–379.
- [6] Yang YQ, Tan YY, Wong R, Wenden A, Zhang LK, Rabie ABM. The role of vascular endothelial growth factor in ossification. *International Journal of Oral Science* 2012; 4(2): 64–68.
- [7] Claesson-Welsh L, Welsh M. VEGFA and tumour angiogenesis. *Journal of Internal Medicine* 2013; 273(2): 114–127.
- [8] Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1962; 48:1014–1022.
- [9] Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J*. 1991; 5(8):2145–2154.
- [10] Werb Z, Ashkenas J, MacAuley A, Wiesen JF. Extracellular matrix remodeling as a regulator of stromal-epithelial interactions during mammary gland development, involution and carcinogenesis. *Braz J Med Biol Res*. 1996; 29(9):1087–1097.
- [11] Zeng ZS, Cohen AM, Guillem JG. Loss of basement membrane type IV collagen is associated with increased expression of metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) during human colorectal tumorigenesis. *Carcinogenesis*. 1999; 20(5):749–755.
- [12] Murnane MJ, Cai J, Shuja S, McAneny D, Klepeis V, Willett JB. Active MMP-2 effectively identifies the presence of colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2009; 125(12):2893–2902.
- [13] Fonsatti E, Sigalotti L, Arslan P, Altomonte M, Maio M. Emerging Role of Endoglin (CD105) as a Marker of Angiogenesis with Clinical Potential in Human Malignancies. *Curr Cancer Drug Targets*. 2003; 3(6):427–32.
- [14] Nassiri F, Cusimano MD, Scheithauer BW, Rotondo F, Fazio A, Yousef GM, et al. Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. *Anticancer Res*. 2011; 31(6):2283–90.
- [15] Levi B, Wan DC, Glotzbach JP, Hyun J, Januszyk M, Montoro D, et al. CD105 protein depletion enhances human adipose-derived stromal cell osteogenesis through reduction of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) signaling. *J Biol Chem*. 2011; 286(45):39497–509.
- [16] Groblewska M, Siewko M, Mroczko B, Szmitkowski M. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in the development of esophageal cancer. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 2012; 50(1): 12–19.
- [17] Qi JH, Ebrahim Q, Ali M, Cutler A, Bell B, Prayson N, et al. Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-3 Peptides

Inhibit Angiogenesis and Choroidal Neovascularization in Mice. *PLoS ONE* 2013; 8(3): e55667.

[18]Leifler KS, Svensson S, Abrahamsson A, Bendrik C, Robertson J, Gaudie J, et al. Inflammation Induced by MMP-9 Enhances Tumor Regression of Experimental Breast Cancer. *J Immunol*. 2013; 190(8):4420-30.

[19]Watanabe K, Hasegawa Y, Yamashita H, Shimizu K, Ding Y, Abe M, et al. Vasohibin as an endothelium-derived negative feedback regulator of angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 2004; 114(7):898-907.

[20]Shimizu K, Watanabe K, Yamashita H, Abe M, Yoshimatsu H, Ohta H, et al. Gene regulation of a novel angiogenesis inhibitor, vasohibin, in endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 327(3):700-706.

[21]Shibuya T, Watanabe K, Yamashita H, Shimizu K, Miyashita H, Abe M, et al. Isolation and characterization of vasohibin-2 as a homologue of VEGF-inducible endothelium-derived angiogenesis inhibitor vasohibin. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006; 26(5):1051-1057.

[22]Kern J, Bauer M, Rychli K, Wojta J, Ritsch A, Gastl G, et al. Alternative splicing of vasohibin-1 generates an inhibitor of endothelial cell proliferation, migration, and capillary tube formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008; 28(3):478-484.

[23]Sato Y. The vasohibin family: a novel family for angiogenesis regulation. *J. Biochem.* 2013; 153(1):5-11.

[24]Goth MI, Hubina E, Raptis S, Nagy GM, Tóth BE. Physiological and pathological angiogenesis in the endocrine system. *Microsc Res Tech* 2003; 60(1): 98-106.

[25]Salcedo X, Medina J, Sanz-Cameno P, García-Buey L, Martín-Vilchez S, Moreno-Otero R. Review article: angiogenesis soluble factors as liver disease markers. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22(1): 23-30.

[26]Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1(1): 27-31.

[27]Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other disease. *Nature*. 2000; 407(6801): 249-257.

[28]Kuo SW, Ke FC, Chang GD, Lee MT, Hwang JJ. Potential role of follicle-stimulating hormone (FSH) and transforming growth factor (TGFβ1) in the regulation of ovarian angiogenesis. *J Cell Physiol* 2011; 226(6): 1608-1619.

[29]Capp C, Wajner SM, Siqueira DR, Brasil BA, Meurer L, Maia AL. Increased expression of vascular endothelial growth factor and its receptors, VEGFR-1 and VEGFR-2, in medullary thyroid carcinoma. *Thyroid*. 2010; 20(8): 863-871.

[30]Iribarren C, Phelps BH, Darbinian JA, McCluskey ER, Quesenberry CP, Hytopoulos E, et al. Circulating angiopoietins-1 and -2, angiopoietin receptor tie-2 and vascular endothelial growth factor-A as biomarkers of acute myocardial infarction: a prospective nested case-control study. *BMC Cardiovasc Disord* 2011; 11: 31.

[31]Zhu AX, Duda DG, Sahani DV, Jain RK. HCC and angiogenesis: possible targets and future directions. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 8(5): 292-301.

[32]Ehrmann RL, Knott M. Choriocarcinoma. Transfilter stimulation of vasoproliferation in the hamster cheek pouch studied by light and electron microscopy. *J Natl Cancer Inst* 1968; 41(6): 1329-1341.

[33]Shim WSN, Ho IAW, Wong PEH. Angiopoietin: A TIE(d) Balance in Tumor Angiogenesis. *Mol Cancer Res* 2007; 5(7):655-665.

[34]Hu B, Cheng SY. Angiopoietin-2: Development of Inhibitors for Cancer Therapy. *Curr Oncol Rep*. 2009; 11(2): 111-116.

[35]Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev* 2008; 22:1276-312.

[36]Madsen CV, Steffensen KD, Waldstrøm M, Andersen RF, Søgaard CH, Brandslund I, et al. Platelet-Derived Growth Factor Gene Polymorphisms in Patients With Ovarian Cancer. *Clinical Ovarian & Other Gynecologic Cancer* 2012; 5(1): 10-16.

[37]Pircher A, Medinger M, Drevs J. Liver cancer: Targeted future options. *World J Hepatol.* 2011; 3(2): 38-44.

[38]Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Chen Y, Park EC, Lu N, et al. Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* 1998; 94(6): 715-725.

[39]Harmey JH, Dimitriadis E, Kay E, Redmond HP, Bouchier-Hayes D. Regulation of macrophage production of vascular endothelial growth factor (VEGF) by hypoxia and transforming growth factor beta-1. *Ann Surg Oncol* 1998; 5(3): 271-278.

[40]Goldfarb SB, Hudis C, Dickler MN. Bevacizumab in metastatic breast cancer: when may it be used? *Ther Adv Med Oncol* 2011; 3(2): 85-93.

[41]Kawasaki T, Kitsukawa T, Bekku Y, Matsuda Y, Sanbo M, Yagi T, Fujisawa H (1999) A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development* 126: 4895-4902

[42]Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M (1998) Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92: 735-745.

[43]Murga M, Fernandez-Capetillo O, Tosato G (2005) Neuropilin-1 regulates attachment in human endothelial cells independently of vascular endothelial growth factor receptor-2. *Blood* 105: 1992-1999.

[44]Pan Q, Chathery Y, Wu Y, Rathore N, Tong RK, Peale F, Bagri A, Tessier-Lavigne M, Koch AW, Watts RJ (2007) Neuropilin-1 binds to VEGF121 and regulates endothelial cell migration and sprouting. *J Biol Chem* 282: 24049-24056.

[45]Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol Rev* 2008; 222: 155-61.

[46]Cassetta L, Cassol E, Poli G. Macrophage polarization in health and disease. *Scientific World Journal* 2011; 11: 2391-402.

[47]Nozawa H, Chiu C, Hanahan D. Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(33): 12493-8.

[48]Christoffersson G, Henriksnas J, Johansson L, Rolny C, Ahlström H, Caballero-Corbalan J, et al. Clinical and experimental pancreatic islet transplantation to striated muscle: establishment of a vascular system similar to that in native islets. *Diabetes* 2010; 59(10): 2569-78.

[49]Xu N, Lei Z, Li XL, Zhang J, Li C, Feng GQ, et al. Clinical Study of Tumor Angiogenesis and Perfusion Imaging Using Multi-slice Spiral Computed Tomography for Breast Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2013; 14(1):429-433.

[50]Brummer O, Athar S, Riethdorf L, Loning T, Herbst H. Matrixmetalloproteinases 1, 2, and 3 and their tissue inhibitors 1 and 2 in benign and malignant breast lesions: an in situ hybridization study. *Virchows Arch* 1999; 435(6):566-573.

[51]Pellikainen JM, Ropponen KM, Kataja VV, Kellokoski JK, Eskelinen MJ, Kosma VM. Expression of matrix

- metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER2, and prognosis. *Clin Cancer Res* 2004; 10(22):7621-7628.
- [52]Dallas NA, Samuel S, Xia L, Fan F, Gray MJ, Lim SJ, et al. Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy. *Clin Cancer Res* 2008; 14(7): 1931-1937.
- [53]Goumans MJ, Lebrin F, Valdimarsdottir G. Controlling the angiogenic switch:a balance between two distinct TGF- β receptor signaling pathways. *Trends Cardiovasc Med* 2003; 13(7):301-307.
- [54]Dales JP, Garcia S, Bonnier P, Duffaud F, Andrac-Meyer L, Ramuz O, et al. CD105 Expression Is a Marker of High Metastatic Risk and Poor Outcome in Breast Carcinomas: Correlations Between Immunohistochemical Analysis and Long-Term Follow-up in a Series of 929 Patients. *Am J Clin Pathol* 2003; 119(3):374-380.
- [55]Fidler IJ, Ellis LM. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* 1994; 79(2): 185–188.
- [56]Fox SB, Gatter KC, Harris A. Tumor angiogenesis. *J. Pathol.* 1996; 179(3): 232–237.
- [57]Gasparini G, Pozza F, Harris AL. Evaluating the potential usefulness of new prognostic and predictive indicators in node-negative breast cancer patients. *J. Natl. Cancer Inst.* 1993; 85(15):1206-19.
- [58]Weidner N. Factor VIII related antigen. *J. Natl. Cancer Inst.* 1993; 85: 674–675.
- [59]Kumar S, Ghellal A, Li C, Byrne G, Haboubi N, Wang JM, et al. Breast Carcinoma: Vascular Density Determined Using CD105 Antibody Correlates with Tumor Prognosis. *Cancer Research* 1999; 59(4): 856–861.
- [60]Wang JM, Kumar S, Pye D, Haboubi N, Nakib L. Breast carcinoma; comparative study of tumor vasculature using two endothelial-cell markers. *J. Natl. Cancer Inst.* 1994; 86(5): 386–388.
- [61]Wang JM, Kumar S, Pye DA, Krupinski J, Hunter RD. A monoclonal antibody detects heterogeneity in vascular endothelium of tumors and normal tissues. *Int. J. Cancer* 1993; 54(3): 363–370.
- [62]Pal S, Moulik S, Dutta A, Chatterjee A. Extracellular matrix protein laminin induces matrix metalloproteinase-9 in human breast cancer cell line MCF-7. *Cancer Microenviron* 2014; 7(1-2):71-78.
- [63]Cardeal LBdS, Boccardo E, Termini L, Rabachini T, Andreoli MA, et al. (2012) HPV16 Oncoproteins Induce MMPs/RECK-TIMP-2 Imbalance in Primary Keratinocytes: Possible Implications in Cervical Carcinogenesis. *PLoS ONE* 2012; 7(3): e33585.
- [64]Abe M, Sato Y. cDNA microarray analysis of the gene expression profile of VEGF-induced human umbilical vein endothelial cells. *Angiogenesis* 2001; 4(4):289-298.
- [65]Kimura H, Miyashita H, Suzuki Y, Kobayashi M, Watanabe K, Sonoda H. Distinctive localization and opposed roles of vasohibin-1 and vasohibin-2 in the regulation of angiogenesis. *Blood* 2009; 113(19):4810-4818.
- [66]Takahashi Y, Koyanagi T, Suzuki Y, Saga Y, Kanomata N, Moriya T, et al. Vasohibin-2 Expressed in Human Serous Ovarian Adenocarcinoma Accelerates Tumor Growth by Promoting Angiogenesis. *Mol Cancer Res.* 2012; 10(9):1135-46.