



# Efecto de la crioterapia en la regulación de la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular y del factor derivado del epitelio pigmentado

## RESUMEN

**Antecedentes:** la crioterapia es una técnica no invasiva que usa frío intenso para congelar y destruir los tejidos cancerosos. Sus efectos en la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular y el factor derivado del epitelio pigmentado no se han descrito.

**Material y métodos:** estudio experimental en modelos experimentales de crioterapia. En la esclera del ojo derecho de 12 cerdos se aplicó un punto de congelamiento durante 10 segundos. Se usaron 3 cerdos como controles normales. Los animales se sacrificaron a los 7, 14 y 21 días y el tejido de coroides y retina se seccionó en áreas de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> circundantes al punto de congelamiento. Los niveles de expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular y factor derivado del epitelio pigmentado se determinaron y analizaron por reacción en cadena de la polimerasa acoplada a reverso-transcripción.

**Resultados:** los niveles de factor de crecimiento del endotelio vascular disminuyeron significativamente (24%,  $p < 0.05$ ) a los 7 días postratamiento, mientras que la expresión del factor derivado del epitelio pigmentado aumentó 44.8% ( $p < 0.05$ ) en comparación con los niveles de las muestras normales. Los niveles de expresión se mantuvieron hasta el día 14 y regresaron a valores basales en el día 21.

**Conclusiones:** este trabajo expone la relación entre la crioterapia y la expresión de dos factores angiogénicos. Los resultados muestran cambios significativos en la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular y factor derivado del epitelio pigmentado, y evidencian que ambas proteínas son reguladas en respuesta al tratamiento criogénico en periodos relativamente cortos (21 días).

**Palabras clave:** factor de crecimiento del endotelio vascular, factor derivado del epitelio pigmentado, crioterapia.

## Effect of cryotherapy over the expression of vascular endothelial growth factor and pigment epithelium-derived factor

### ABSTRACT

**Background:** Cryotherapy is a no invasive technique that uses intense cold to freeze and destroy cancer tissues. There are no descriptions of

Julia Dolores Toscano-Garibay<sup>1</sup>  
Hugo Quiroz-Mercado<sup>2</sup>  
Clara Espitia-Pinzón<sup>3</sup>  
Félix Gil-Carrasco<sup>4</sup>  
José Javier Flores-Estrada<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dirección de Investigación, Hospital Juárez de México, México DF.

<sup>2</sup> Denver Health Medical Center-Vision Center, Davis Pavilion-North Tower, Denver, Colorado.

<sup>3</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF.

<sup>4</sup> Asociación para Evitar la Ceguera en México, Institución de Asistencia Privada. Dr. Lui Sánchez Bulnes, México DF.

Recibido: 24 de abril 2013

Aceptado: 12 de septiembre 2013

### Correspondencia

Dr. J. Javier Flores Estrada  
Dirección de Investigación  
Hospital Juárez de México  
Av. Instituto Politécnico Nacional 5160  
07760 México DF  
Tel.: 5747-7560 ext. 7476  
javier\_70\_1999@yahoo.com

its effects over the expression of vascular endothelial growth factor and pigment epithelium-derived factor.

**Methods:** Experimental study in cryogenic spot were applied in the right sclera of twelve pigs for ten minutes. Other 3 pigs were used as normal controls. Animals were sacrificed at 7, 14 and 21 and the tissues of chorioides and retina were dissected in areas of approximately 1 cm<sup>2</sup> surrounding cryogenic spots. Expression levels of vascular endothelial growth factor and pigment epithelium-derived factor were determined analyzed using polymerase chain reaction coupled to reverse-transcription.

**Results:** Vascular endothelial growth factor was significantly downregulated (24%,  $p < 0.05$ ) seven days post-treatment meanwhile pigment epithelium-derived factor levels increased 44.8% ( $p < 0.05$ ) as compared to normal controls (untreated). Both vascular endothelial growth factor and pigment epithelium-derived factor levels remain the same until day 14 but returned to basal expression at day 21.

**Discussion:** This work expose the relation of cryotherapy with the expression of two factors related to angiogenesis. Results showed significant changes on the expression of vascular endothelial growth factor and pigment epithelium-derived factor illustrating that both proteins are regulated in response to cryogenic treatment in relatively short periods (21 days).

**Key words:** Vascular endothelial growth factor, pigment-epithelium derived factor, cryotherapy.

## ANTECEDENTES

La angiogénesis es un proceso de múltiples fases en la formación de vasos sanguíneos y es crítico para la preservación de todos los tejidos. Lo normal es que exista un equilibrio fisiológico estrictamente regulado por la expresión de factores angiogénicos y antiangiogénicos que mantenga la vasculatura en un estado relativo de quiescencia.<sup>1,2</sup>

La neovascularización es un término que suele aplicarse a la angiogénesis causada por condiciones patológicas. Diversos factores angiogénicos se relacionan con el proceso de neovascularización. Algunos de ellos producen el crecimiento de nuevos vasos, como el factor

de crecimiento del endotelio vascular, y otros lo inhiben, como el factor derivado del epitelio pigmentado.<sup>3-10</sup>

El factor de crecimiento del endotelio vascular es una glicoproteína secretada en condiciones de hipoxia<sup>11-13</sup> que se asocia con la aparición de tumores y de diversas patologías que involucran a la neovascularización intraocular.<sup>14,15</sup> El factor de crecimiento del endotelio vascular promueve la permeabilidad vascular, proliferación y migración de las células endoteliales y protege a los tejidos adyacentes a la apoptosis.<sup>16,17</sup>

El factor derivado del epitelio pigmentado es una glicoproteína que pertenece a la superfamilia de inhibidores de serina proteasas.<sup>18</sup> Actúa



como una sustancia inhibidora del estímulo angiogénico y como factor neurotrópico funcional.<sup>19,20</sup> Promueve la apoptosis endotelial, inhibe el crecimiento, la migración de células endoteliales y la permeabilidad vascular.<sup>21</sup> Sus concentraciones en el vítreo están disminuidas en pacientes con retinopatía diabética donde la proliferación de células endoteliales está incrementada. Recientemente se investigó muy a fondo, en el campo de la angiogénesis normal y la asociada con tumores, el factor derivado del epitelio pigmentado. Durante el proceso de neovascularización el equilibrio fisiológico entre los factores inhibidores y estimulantes de la angiogénesis se pierde; es decir, el estímulo angiogénico prevalece sobre la inhibición.<sup>22,23</sup> Este cambio promueve el crecimiento tumoral y la metástasis.<sup>18,23,24</sup> Ambos factores se utilizan como blancos terapéuticos para regular la expresión y función de otros componentes relacionados con este fenómeno.

La construcción de proteínas recombinantes o anticuerpos monoclonales en contra de los ligandos y receptores del factor de crecimiento del endotelio vascular y del factor derivado del epitelio pigmentado permite la supresión del surgimiento de nuevos vasos alrededor del tumor y los debidos a la inducción de la muerte celular. Debido al alto costo de este tratamiento es difícil que la población de escasos recursos pueda acceder a ellos. La fotocoagulación, radioterapia y la crioterapia son otros tratamientos que reducen la neovascularización. La crioterapia se utiliza comúnmente como un tipo de tratamiento tumoral en sitios donde los recursos son escasos; sin embargo, también se usa en otro tipo de padecimientos vasculares. La técnica consiste en la aplicación de pequeños puntos criogénicos alrededor de la lesión mediante una sonda electrónica que alcanza temperaturas inferiores a 0<sup>o</sup><sup>25</sup> para establecer una barrera definida alrededor del área afectada causando el mínimo daño al tejido sano adyacente.<sup>26</sup> Durante la crioterapia

se forman cristales de hielo en las células que provocan una ruptura mecánica de las membranas y se delinean las zonas necróticas. Se ha propuesto que las concentraciones salinas elevadas en el frente de congelamiento son letales para las células debido al encogimiento causado por la captación de agua desde el interior de la célula.<sup>27,28</sup> Además, se ha reportado la aparición de células apoptóticas en el frente de formación del hielo, donde la temperatura no es lo suficientemente baja para matar a las células de forma instantánea.<sup>29</sup>

También se desconoce si la crioterapia tiene efectos adicionales a la destrucción física de las células en la zona periférica al punto de congelamiento, como la alteración en el equilibrio de la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular y del factor derivado del epitelio pigmentado. Este estudio muestra, en un modelo animal, que después de la crioterapia los niveles de expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular y del factor derivado del epitelio pigmentado son afectados en el tejido adyacente al punto de congelamiento.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio experimental en modelos experimentales de crioterapia. *Animales:* se utilizaron 15 cerdos de la raza landrace de 3 a 4 meses de edad. Los animales se trataron de acuerdo con la regulación del cuidado y uso de animales de laboratorio descrita en la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) y con la declaración para el uso de animales en investigación oftálmica y visual (ARVO 2007). Previo a la experimentación los animales permanecieron un periodo de aclimatación de 7 días en un bioterio equipado con jaulas suficientes para albergar un animal individualmente, aislados de contaminación auditiva, a una temperatura ambiental de 25°C y alimentados con dieta balanceada rica en proteínas y fibra cruda. Las condiciones de luz y

oscuridad se regularon en ciclos alternados de 12 horas. El cuidado y manejo de los animales lo realizó diariamente un médico veterinario. Antes del tratamiento los cerdos se anestesiaron por vía intramuscular con 30 mg/kg de pentobarbital y las pupilas se dilataron con fenilefrina 2.5% y tropicamida 1%.

#### *Modelo experimental de crioterapia*

Para investigar el efecto de la crioterapia se aplicó CO<sub>2</sub> líquido con una sonda durante 10 segundos en la región temporal de 12 ojos derechos. Otros tres cerdos se utilizaron como controles normales (sin tratamiento). Los animales se sacrificaron a los 7, 14 y 21 días después del tratamiento. Los ojos se enuclearon y los tejidos de coroides y retina se seccionaron a un cm<sup>2</sup> alrededor del sitio del punto de congelamiento.

#### *Extracción de RNA y reacción en cadena de la polimerasa acoplada a reverso-transcripción (RT-PCR)*

Los tejidos permanecieron en solución estabilizadora de RNA (RNAlater, Qiagen, USA) a 4°C por 24 horas. Las muestras se lavaron con amortiguador TE 1X (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 8.0) y se centrifugaron a 10,000 x g durante 5 minutos. El tejido se transfirió a un tubo que contenía 200 µL de TE 1X, 100 µL de perlas de vidrio de 0.1 mm de diámetro (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y 400 µL de solución de lisis. El tejido se homogeneizó con un instrumento Fast-prep (Ribolyser Bio101, Carlsbad, CA) con 5 pulsos de 4.5 m/s, alternados cada 30 s. Posteriormente se extrajo el RNA y purificó de acuerdo con el protocolo descrito para el equipo High Pure RNA (Roche-applied-science, IN, USA). La calidad y cantidad del RNA se determinó por espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa. Para la reacción de RT-PCR se usó el sistema Titan One Tube RT-PCR (Roche-applied-science, IN, USA). Se usaron 85 ng de RNA total y 10 pmoles de

los oligonucleótidos del factor de crecimiento del endotelio vascular y del factor derivado del epitelio pigmentado y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) que generó los fragmentos de 191, 225 y 422 pb, respectivamente. La síntesis del cDNA se realizó a 55°C durante 30 minutos y se amplificó por 25 ciclos (desnaturalización a 94°C durante 30 s, hibridación a 58°C durante 30 s, y polimerización a 68°C por espacio de 40 s).

#### *Oligonucleótidos y análisis de expresión*

Los oligonucleótidos se diseñaron para amplificar regiones comprendidas entre dos exones, separados por intrones con las siguientes secuencias: factor de crecimiento del endotelio vascular (FWD= 5'-CTCTACCTCCACCATGCCAAGTG-3' y REV= 5'-CTGGCCTTGGTGAGGTTTGATCC-3'); factor derivado del epitelio pigmentado (FWD= 5'-CCCATGATGTCCGACCCTAAG-3' y REV= 5'-CGCCTTCGTAACCTCAGCTCAG-3') y GAPDH (FWD= 5'-GTCATCATCTCTGCCCCCTCTG-3' y REV= 5'-ACGCCTGCTTCACCACCTTC-3'). Este último se usó como valor de referencia para determinar los niveles de expresión entre los factores estudiados. Los productos amplificados se analizaron en el programa Doc-It LS (UVP, Inc. Cambridge UK). La intensidad de las bandas se capturó en píxeles y los valores se extrapolaron a porcentaje de expresión considerando los valores basales de las muestras normales.

#### *Análisis estadístico*

Se procesó en el programa SPSS versión 15 para Windows 7 (SPSS, Inc, Chicago, Illinois, USA). Para determinar las diferencias entre los grupos se aplicó un análisis ANOVA de una sola vía, seguido por la prueba de Tukey. Para las diferencias en la expresión entre el factor de crecimiento del endotelio vascular y el factor derivado del epitelio pigmentado en cada día postratamiento se calculó el cociente entre los



porcentajes de expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular entre el factor derivado del epitelio pigmentado. Se consideró diferencia estadísticamente significativa cuando los valores de  $p$  fueron menores a 0.05.

## RESULTADOS

Los niveles de expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular y del factor derivado del epitelio pigmentado se midieron por RT-PCR (Figura 1A). En el Cuadro 1 se resumen los valores de expresión de las muestras controles y de las provenientes de los tejidos con crioterapia. Siete días después de la crioterapia el nivel del factor de crecimiento del endotelio vascular fue menor en 24% ( $69.66 \pm 0.5774$ ,  $p < 0.05$ ) mientras que la expresión del factor derivado del epitelio pigmentado se incrementó en 44.8% ( $108 \pm 0.5774$ ,  $p < 0.05$ ). Al día 14, los niveles del factor de crecimiento del endotelio vascular en el grupo tratado con crioterapia permanecieron con valores bajos ( $71 \pm 1.0$ ) y los niveles de expresión del factor derivado del epitelio pigmentado permanecieron en 43.7% ( $119.33 \pm 0.5774$ ).

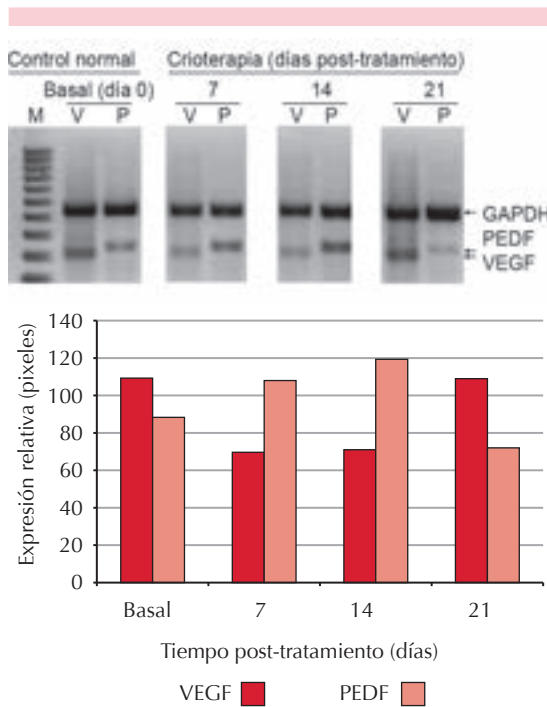
La diferencia entre ambas proteínas fue significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a los valores de expresión de los controles. En el día 21 los niveles del factor de crecimiento del endotelio vascular regresaron a valores de expresión basal sin diferencia significativa ( $109 \pm 1.0$ ) (Cuadro 1), mientras que los niveles del factor derivado del epitelio pigmentado disminuyeron en 22% en el grupo de crioterapia ( $72 \pm 1.0$ ) (Figura 1B).

El cociente entre la concentración del factor de crecimiento del endotelio vascular dividido entre el factor derivado del epitelio pigmentado de los niveles de expresión basal fue 1.25. Este valor cambió a 0.61 y 0.55 para las muestras obtenidas en los días 7 y 14 postratamiento. Para las muestras del día 21 fue 1.51 (Figura 2).

## DISCUSIÓN

La crioterapia es un tratamiento que suele aplicarse en una serie de padecimientos que involucran la neovascularización tisular, como el cáncer y las enfermedades oculares crónico-degenerativas.<sup>30-33</sup> Se ha propuesto que el mecanismo de destrucción celular que ocurre en los tejidos tratados con crioterapia incluye la activación en la zona periférica al punto de congelamiento de las vías apoptóticas intrínseca y extrínseca. Esta última es mediada por la expresión del ligando activador de apoptosis relacionado con TNF- $\alpha$  que, a su vez, inicia la vía de las caspasas.<sup>34,35</sup> Además, se ha mostrado que la crioterapia induce condiciones hipóxicas en la zona periférica al punto de congelamiento incrementando la apoptosis; se correlaciona negativamente con la densidad de microvasos en un modelo de cáncer de próstata.<sup>36</sup> Sin embargo, no existen reportes que describan el proceso angiogénico posterior a la crioterapia, particularmente en la zona periférica al punto de congelamiento. En condiciones de hipoxia se promueve la neovascularización mediada por la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular que activa la vía de señalización de las proteínas-cinasas activadas por mitógenos y la producción de metaloproteasas (MMPs).<sup>24,37</sup> En contraste, el factor derivado del epitelio pigmentado es un inductor de apoptosis y su presencia también se ha asociado con la neovascularización al involucrar la inhibición de la ruta HIF-1 $\alpha$ /MAP cinasa mediante la competencia por unión al receptor 2 del factor de crecimiento del endotelio vascular.<sup>38,39</sup>

Nuestros datos muestran que después de la crioterapia se rompe el equilibrio entre el factor de crecimiento del endotelio vascular y el factor derivado del epitelio pigmentado con cambios significativos hasta los 14 días, restableciendo las concentraciones de ambas proteínas hacia el día 21. Estas observaciones sugieren el efecto

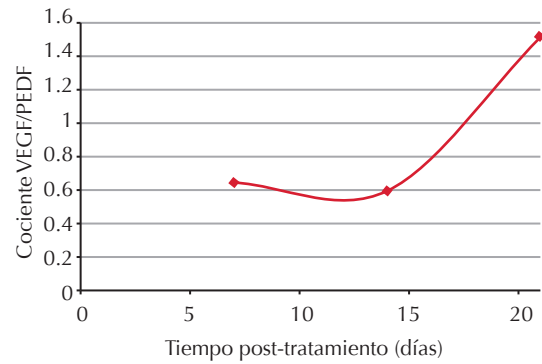


**Figura 1.** Cuantificación de las concentraciones del factor de crecimiento del endotelio vascular y el factor derivado del epitelio pigmentado. A) Gel de agarosa con los productos de amplificación de los genes del factor derivado del epitelio pigmentado (P), del factor de crecimiento del endotelio vascular (V) y de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa expresados en tejido porcino a los 0 (basal, control normal), 7, 14 y 21 días después del tratamiento con crioterapia. El gen GAPDH se amplificó simultáneamente en la reacción como control interno. B) Gráfica que representa la expresión relativa del factor de crecimiento del endotelio vascular y del factor derivado del epitelio pigmentado.

**Cuadro 1.** Análisis de los datos obtenidos de la expresión relativa del factor de crecimiento del endotelio vascular y del factor derivado del epitelio pigmentado (media ± DE) a los 0 (control normal), 7, 14 y 21 días.

	Control normal	7	14	21	p
VEGF (C.R.)	109.3±0.5774	69.66±0.5774	71±1.0	109±1.0	< 0.05
<b>% de expresión</b>	<b>48.3</b>	<b>24</b>	<b>24</b>	<b>47.7</b>	
PEDF (C.R.)	88.3±0.5774	108±0.5774	119.33±.5774	72±1.0	< 0.05
<b>% de expresión</b>	<b>38.6</b>	<b>44.8</b>	<b>43.7</b>	<b>22</b>	
Cociente VEGF/PEDF	1.25	0.66	0.7	1.58	

VEGF= factor de crecimiento del endotelio vascular, PEDF= factor derivado del epitelio pigmentado. C.R.= Concentración relativa. Los valores en negrillas representan el porcentaje de expresión relativa de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.



VEGF= factor de crecimiento del endotelio vascular, PEDF= factor derivado del epitelio pigmentado.

**Figura 2.** Gráfica del cociente entre la concentración del factor de crecimiento del endotelio vascular dividido por la del factor derivado del epitelio pigmentado contra el tiempo después de la crioterapia. ■ = VEGF, ■ = PEDF.

dual del tratamiento, por un lado una pobre estimulación angiogénica debida a las bajas concentraciones del mensajero de factor de crecimiento del endotelio vascular; y, por otro, los valores altos del factor derivado del epitelio pigmentado podrían, también, sugerir la activación de la muerte celular. Estudios previos muestran que el factor derivado del epitelio pigmentado activa, indirectamente, la apoptosis mediada por TRAIL, a través de PPAR-g que es secretado por los macrófagos localizados en las zonas hipóxicas.<sup>40</sup> Así, el aumento del factor derivado del epitelio pigmentado podría





ser responsable de la disminución del factor de crecimiento del endotelio vascular durante el tratamiento por una vía independiente al factor inducido por hipoxia tipo  $1\alpha$ ; es evidente que la regulación entre estas dos proteínas es decisiva para conservar el equilibrio entre los procesos angiogénicos y anti-angiogénicos. El cociente entre la concentración del factor de crecimiento del endotelio vascular dividido entre la del factor derivado del epitelio pigmentado mostró un desequilibrio con valores menores a 1 hasta el día 14, y mayores a 1 cuando los tejidos se restauran en el día 21, lo que podría deberse a la aparición de un pico de reparación o proliferativo. Si bien los datos aquí expuestos están sujetos a mayor confirmación, puede proponerse a este cociente como un auxiliar en la determinación del estado proliferativo que toma lugar en otros padecimientos de degeneración vascular.

## CONCLUSIONES

Este trabajo expone la relación entre la crioterapia y la expresión de dos factores angiogénicos. Los resultados muestran cambios significativos en la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular y del factor derivado del epitelio pigmentado, por un lado disminuye la estimulación angiogénica y por otro activa la muerte celular. Con estos datos proponemos al cociente entre la expresión de estos factores como un posible indicador del estado de progresión de padecimientos con degeneración vascular.

## Referencias

- Murukesh N, Dive C, Jayson GC. Biomarkers of angiogenesis and their role in the development of VEGF inhibitors. *Br J Cancer* 2010;102:8-18.
- Raica M, Cimpean AM. Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)/PDGF Receptors (PDGFR) Axis as Target for Antitumor and Antiangiogenic Therapy. *Pharmaceuticals* 2010;3:572-599.
- Wang F, Rendahl KG, Manning WC, Quiroz D, Coyne M, Miller SS. AAV-Mediated Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Induces Choroidal Neovascularization in Rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:781-790.
- Sivalingam A, Kenney J, Brown GC, Benson WE, Donoso L. Basic Fibroblast Growth Factor Levels in the Vitreous of Patients with Proliferative Diabetic Retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1990;108:869-872.
- Grant M, Russell B, Fitzgerald C, Merimee TJ. Insulin-Like Growth Factors in Vitreous. Studies in Control and Diabetic Subjects with Neovascularization. *Diabetes* 1986;35:416-420.
- Meyer-Schwickerath R, Pfeiffer A, Blum WF, Freyberger H, Klein M, Lösche C, et al. Vitreous levels of the insulin-like growth factors I and II, and the insulin-like growth factor binding proteins 2 and 3, increase in neovascular eye disease. Studies in nondiabetic and diabetic subjects. *J Clin Invest* 1993;92:2620-2625.
- Elnor SG, Strieter R, Bian ZM, Kunkel S, Mokhtarzaden L, Johnson M, et al. Interferon-Induced Protein 10 and Interleukin 8 C-X-C Chemokines Present in Proliferative Diabetic Retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1998;116:1597-1601.
- Yoshida A, Yoshida S, Khalil AK, Ishibashi T, Inomata H. Role of NF-kappaB-mediated interleukin-8 expression in intraocular neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:1097-1106.
- Khaliq A, Foreman D, Ahmed A, Weich H, Gregor Z, McLeod D, et al. Increased expression of placenta growth factor in proliferative diabetic retinopathy. *Labor Invest J Technical Methods Pathol* 1998;78:109-116.
- Katsura Y, Okano T, Noritake M, Kosano H, Nishigori H, Kado S, et al. Hepatocyte Growth Factor in Vitreous Fluid of Patients With Proliferative Diabetic Retinopathy and Other Retinal Disorders. *Diabetes Care* 1998;21:1759-1763.
- Hellstrom A, Perruzzi C, Ju M, Engström E, Hård AL, Liu JL, et al. Low IGF-I suppresses VEGF-survival signaling in retinal endothelial cells: Direct correlation with clinical retinopathy of prematurity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:5804-5808.
- Lashkari K, Hirose T, Yazdany J, McMeel JW, Kazlauskas A, Rahimi N. Vascular Endothelial Growth Factor and Hepatocyte Growth Factor Levels are Differentially Elevated in Patients with Advanced Retinopathy of Prematurity. *Am J Pathol* 2000;156:1337-1344.
- Pierce EA, Foley ED, Smith LE. Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor by Oxygen in a Model of Retinopathy of Prematurity. *Arch Ophthalmol* 1996;114:1219-1228.
- Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Bio Chem* 1991;266:11947-11954.
- Yoo MH, Hyun HJ, Koh JY, Yoon YH. Riluzole Inhibits VEGF-Induced Endothelial Cell Proliferation In Vitro and Hyperoxia-Induced Abnormal Vessel Formation In Vivo. *Invest Ophthalmol and Vis Sci* 2005;46:4780-4787.

16. Ferrari G, Pintucci G, Seghezzi G, Hyman K, Galloway AC, Mignatti P. VEGF, a Prosurvival Factor, Acts in Concert with TGF-beta1 to Induce Endothelial Cell Apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:17260-17265.
17. Distler JH, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, Gay RE, Gay S, Distler O. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med* 2003;47:149-161.
18. Ogata N, Nishikawa M, Nishimura T, Mitsuma Y, Matsumura M. Unbalanced vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy. *Am J Opht* 2002;134:348-353.
19. Ogata N, Nishikawa M, Nishimura T, Mitsuma Y, Matsumura M. Inverse levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor in the vitreous of eyes with rhegmatogenous retinal detachment and proliferative vitreoretinopathy. *Am J Opht* 2002;133:851-852.
20. Notari L, Miller A, Martínez A, Amaral J, Ju M, Robinson G, et al. Pigment Epithelium-Derived Factor is a Substrate for Matrix Metalloproteinase Type 2 and Type 9: Implications for Down regulation in Hypoxia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:2736-2747.
21. Stellmach V, Crawford SE, Zhou W, Bouck N. Prevention of ischemia-induced retinopathy by the natural ocular antiangiogenic agent pigment epithelium-derived factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:2593-2597.
22. Matsuoka M, Ogata N, Otsuji T, Nishimura T, Takahashi K, Matsumura M. Expression of pigment epithelium derived factor and vascular endothelial growth factor in choroidal neovascular membranes and polypoidal choroidal vasculopathy. *Br J Ophthalmol* 2004;88:809-815.
23. Noma H, Funatsu H, Yamashita H, Kitano S, Mishima HK, Hori S. Regulation of Angiogenesis in Diabetic Retinopathy: Possible Balance Between Vascular Endothelial Growth Factor And Endostatin. *Arch Ophthalmol* 2002;120:1075-1080.
24. Gao G, Li Y, Gee S, Dudley A, Fant J, Crosson C, et al. Down-regulation of Vascular Endothelial Growth Factor and Up-Regulation of Pigment Epithelium-derived Factor: A Possible Mechanism for the Anti-Angiogenic Activity of Plasminogen Kringle 5. *J Biol Chem* 2002;277:9492-9497.
25. Cosano Povedano A. Old Methods, New Applications. *Arch Bronconeumologia* 2010;46:109-110.
26. Li Y, Wang F, Wang H. Cell death along single microfluidic channel after freeze-thaw treatments. *Biomicrofluidics* 2010;4:014111. doi: 10.1063/1.3324869.
27. Gage AA. History of cryosurgery. *Semin Surg Oncol* 1998;14:99-109.
28. Whittaker DK. Mechanisms of tissue destruction following cryosurgery. *Ann R Coll Surg Engl* 1984;66:313-318.
29. Sabel MS. Cryo-immunology: A review of the literature and proposed mechanisms for stimulatory versus suppressive immune responses. *Cryobiology* 2009;58:1-11.
30. Forest V, Peoc'h M, Campos L, Guyotat D, Vergnon JM. Benefit of a combined treatment of cryotherapy and chemotherapy on tumour growth and late cryo-induced angiogenesis in a non-small-cell lung cancer model. *Lung Cancer* 2006;54:79-86.
31. Puzstaszeri M, Vlastos G, Kinkel K, Pelte MF. Histopathological study of breast cancer and normal breast tissue after magnetic resonance-guided cryotherapy ablation. *Cryobiology* 2007;55:44-51.
32. Pearce IA, Pennie FC, Gannon LM, Weindling AM, Clark DI. Three year visual outcome for treated stage 3 retinopathy of prematurity: cryotherapy versus laser. *Br J Ophthalmol* 1998;82:1254-1259.
33. Gage AA, Baust JM, Baust JG. Experimental cryosurgery investigations in vivo. *Cryobiology* 2009;59:229-243.
34. Maccini M, Sehart D, Pompeo A, Chicoli FA, Molina WR, Kim FJ. Biophysiological considerations in cryoablation: a practical mechanistic molecular review. *Int Braz J Urol* 2011;37:693-696.
35. Robilotto AT, Baust JM, Van Buskirk RG, Gage AA, Baust JG. Temperature-dependent activation of differential apoptotic pathways during cryoablation in a human prostate cancer model. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2013;16:41-49.
36. Kimura M, Rabbani Z, Mouraviev V, Tsvivan M, Vujkovic Z, Satoh T, et al. Morphology of hypoxia following cryoablation in a prostate cancer murine model: Its relationship to necrosis, apoptosis and, microvessel density. *Cryobiology* 2010;61:148-154.
37. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-676.
38. Shao H, Schwartz I, Shaltiel S. Secretion of pigment epithelium-derived factor. Mutagenic study. *Europ J Biochem/FEBS* 2003;270:822-831.
39. Zhang SX, Wang JJ, Gao G, Parke K, Ma JX. Pigment epithelium-derived factor down regulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and inhibits VEGF-VEGF receptor 2 binding in diabetic retinopathy. *J Mol Endocrinol* 2006;37:1-12.
40. Ho TC, Chen SL, Shih SC, Chang SJ, Yang SL, Hsieh JW, et al. Pigment Epithelium-derived Factor (PEDF) Promotes Tumor Cell Death by Inducing Macrophage Membrane Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL). *J Biol Chem* 2011;286:35943-35954.