



VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA

TESIS DOCTORAL

Nuevo enfoque terapéutico de la  
Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria

Laura Silva Sousa

Salamanca, 23 de septiembre de 2023



LA DOCTORA **DÑA. ALICIA RODRIGUEZ BARBERO**, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y EL DOCTOR **D. MIGUEL PERICACHO BUSTOS**, PROFESOR CONTRATADO DOCTOR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICAN

Que el presente trabajo, titulado **“Nuevo enfoque terapéutico de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria”**, presentado por Dña. **Laura Silva Sousa** para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizado bajo su dirección en el Área de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, y creyendo que cumple las condiciones necesarias, lo consideran finalizado y autoriza su presentación a fin de que pueda ser defendido ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expide y firma el presente certificado, en

Salamanca, a 21 de julio de 2023.

Dra. Dña. Alicia Rodríguez Barbero

Dr. D. Miguel Pericacho Bustos



Debido a que parte de los datos obtenidos son susceptibles de protección intelectual en forma de patente (en proceso de solicitud), la información o los datos presentados en el presente trabajo no se pueden hacer públicos sin la autorización expresa del autor o sus directores.



Esta Tesis Doctoral ha sido financiada con el contrato para Investigadores Predoctorales de la Junta de Castilla y León (convocatoria de 2018)



*A mi familia y amigos,*



Simplemente mil gracias a todos los que  
habéis hecho posible que llegue este día,



# Índice








Hipótesis .....	37
Objetivo general .....	38
Objetivos específicos.....	38
<b>Materiales y métodos</b> .....	41
1. Animales de experimentación.....	43
1.1. Modelo de ratón HHT 1. Ratones <i>knockout</i> condicionales de endoglina.....	43
1.2. Determinación del genotipo de animales.....	45
1.3. Mantenimiento y manipulación de los animales .....	48
	
	
	
2.2. Condiciones de cultivo celular .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
3. Experimentos <i>in vivo</i> .....	49
3.1. Generación de heridas subcutáneas .....	49
3.2. Perfusión de la vasculatura del ratón con látex azul.....	51
4. Western Blot.....	52
5. Histología.....	55
5.1. Tinción Hematoxilina-Eosina (HE).....	55
5.2. Tinción Weigert-Van Gieson (WVG) .....	56
5.3. Tricrómico de Masson (TM) .....	56
5.4. Inmunohistoquímica (IHQ).....	57
6. Análisis de imagen.....	58
6.1. Análisis de las malformaciones arteriovenosas .....	58
6.2. Análisis histológico .....	62
7. Diseño experimental.....	65
8. Tratamiento de datos y análisis estadístico .....	66
Información de anticuerpos, reactivos, soluciones, material, equipo y software ....	67
Material.....	67










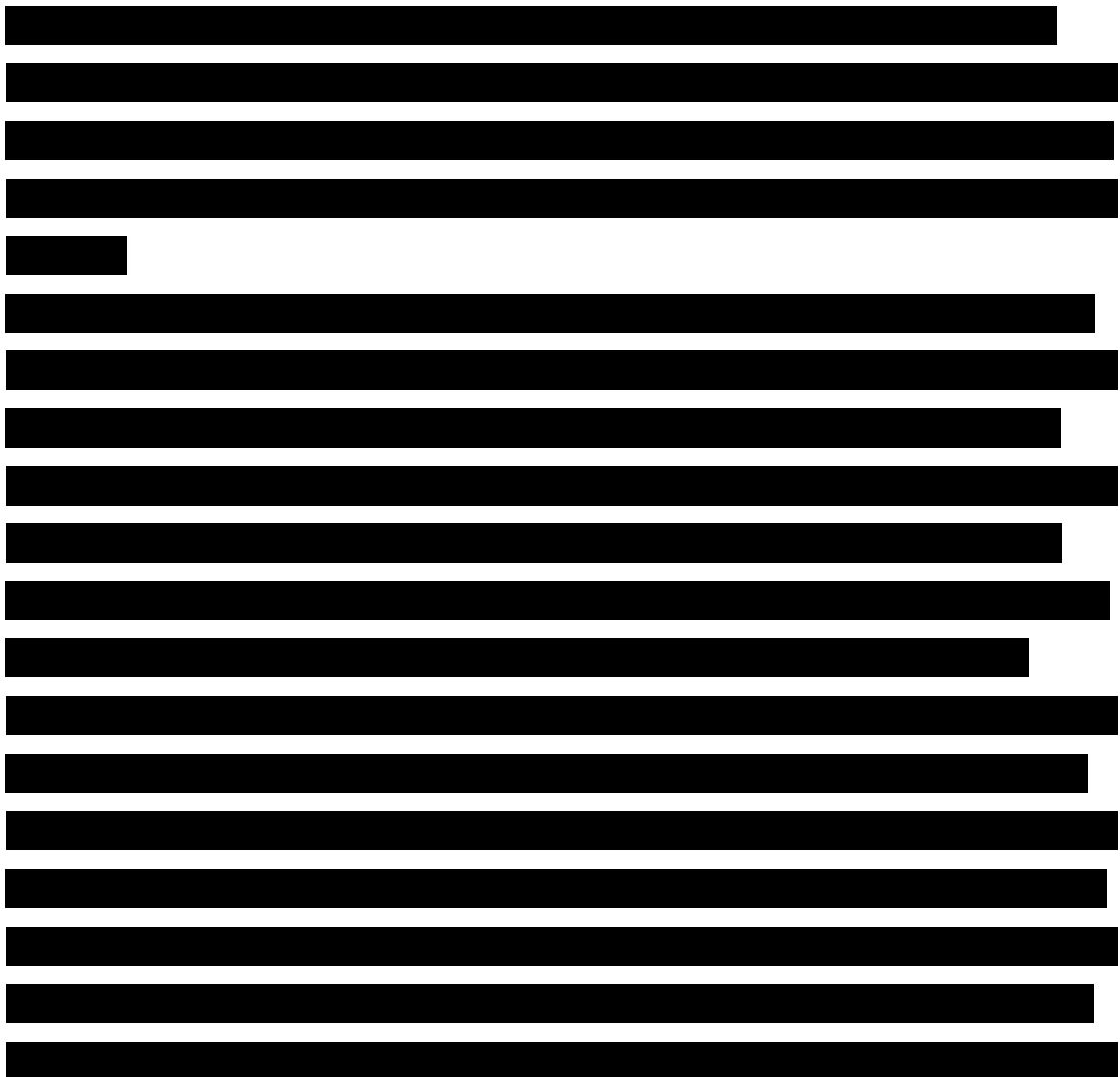
Figura 11: Representación esquemática de la generación de heridas dobles en el lomo del ratón mediante un punch de biopsia de 5mm. ....	49
	
	
	
Figura 13: Representación esquemática del método de perfusión de látex mediante bombas de perfusión con previa anestesia con pentobarbital seguida de recogida de la zona de la espalda con las heridas generadas. ....	52
Figura 14: Representación esquemática de los grados de MAV según la clasificación clínica de Yakes. ....	59
Figura 15: Representación esquemática de la selección de los pixeles de tonalidad azul que se corresponden con los vasos perfundidos con látex, usando para ello la herramienta de la varita mágica del Adobe Photoshop. ....	60
Figura 16: Representación esquemática de la medición del diámetro de los vasos perfundidos con látex usando la herramienta de la regla del Adobe Photoshop. ....	60
Figura 17: Representación esquemática de la cuantificación de los parámetros área y perímetro de la vasculatura de las heridas cutáneas usando el software Fiji. ....	61
Figura 18: Representación esquemática de la herramienta “Skeletonize (2D/3D)” de Fiji. ....	62
Figura 19: Representación esquemática de la cuantificación de los parámetros área y perímetro de los vasos en las fotos de las tinciones Tricrómico de Masson e inmunohistoquímica de $\alpha$ -SMA usando el software Fiji. ....	63
Figura 20: Cuantificación de la expresión de los marcadores inmunes HGF y TNF- $\alpha$ usando el plugin IHC Profiler seleccionando el modelo “H-DAB” del software Fiji. .	64
Figura 21: Microfotografía de la tinción de inmunohistoquímica de F4/80 que tiñe los macrófagos totales donde se enmarca la zona considerada perivascular. ....	65
Figura 22: Representación esquemática del diseño experimental llevado a cabo. ....	65
Figura 23: Expresión génica y proteica de endoglina tras la administración de tamoxifeno. ....	80
Figura 24: Microfotografías de vasos perfundidos con látex de un ratón control (A) y un ratón Eng <sup>-/-</sup> (B) .....	82

Figura 25: Cuantificación del área vascular ocupada por el látex y calibre de los vasos en los ratones control y <i>Eng<sup>-/-</sup></i> .....	83
Figura 26: Análisis de los grados de MAV y gravedad en los ratones control y <i>Eng<sup>-/-</sup></i> .....	85
Figura 27: Análisis de los grados de tortuosidad de MAV en los ratones control y <i>Eng<sup>-/-</sup></i> .....	86
Figura 28: Análisis de varios parámetros de complejidad en los distintos grados de MAV. ....	89
Figura 29: Microfotografías representativas de la tinción de Hematoxilina-Eosina en los ratones control (izquierda) y <i>Eng<sup>-/-</sup></i> (derecha). ....	91
Figura 30: Microfotografías representativas de la tinción de Tricrómico de Masson (fila superior), de la tinción inmunohistoquímica de $\alpha$ -SMA (fila intermedia) y de la tinción de Weigert-Van Gieson (fila inferior) en los ratones control (izquierda) y <i>Eng<sup>-/-</sup></i> (derecha). ....	93



## Índice de tablas

Tabla 1: Representación esquemática de los criterios implicados en el diagnóstico de HHT.....	10
Tabla 2: Representación esquemática de los principales genes afectados en HHT....	11
Tabla 3: Descripción de cebadores utilizados para el genotipado de los ratones. ...	46
Tabla 4: Material utilizado.....	67
Tabla 5: Reactivos y productos utilizados en este trabajo.....	68
Tabla 6: Soluciones utilizadas.....	71
Tabla 7: Anticuerpos utilizados en este trabajo .....	72
Tabla 8: Equipo utilizado en este trabajo.....	73
Tabla 9: Software utilizado.....	74






# Abreviaturas y Glosario



## Siglas, abreviaturas y acrónimos

<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	Actina de músculo liso vascular liso vascular $\alpha$ ( $\alpha$ Smooth Muscle Actin)
<b>ALK1 o</b>	Quinasa similar a activina Tipo I ( <i>Activin receptor-like kinase 1</i> )
<b>ACVRL1</b>	
<b>AVMA</b>	Asociación americana de medicina veterinaria ( <i>American Veterinary Medical Association</i> )
<b>BMP9</b>	Proteína morfogénica ósea 9 ( <i>Bone Morphogenetic Protein 9</i> )
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino ( <i>Bovine Serum Albumine</i> )
<b>DAB</b>	Diaminobencidina
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DPX</b>	<i>Distyrene-Plasticiser-Xylene</i>
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético ( <i>Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate</i> )
<b>EEM</b>	Error estándar de la media
<b>ENG</b>	Endoglina humana
<b>Eng</b>	Endoglina de ratón
<b>GDF2</b>	Factor de Crecimiento y Diferenciación 2 ( <i>Growth / Differentiation factor 2</i> )
<b>GI</b>	Gastrointestinal
<b>HE</b>	Hematoxilina-Eosina
<b>HGF</b>	Factor de crecimiento hepático ( <i>Hepatocyte Growth Factor</i> )
<b>HHT</b>	Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria ( <i>Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia</i> )
	
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano picante ( <i>Horseradish Peroxidase</i> )
<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica

<b>KO</b>	Ratón al que se le ha eliminado la expresión de ambas copias del gen ( <i>Knockout mouse</i> )
<b>MAV</b>	Malformaciones Arteriovenosas
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase chain reaction</i> )
<b>PVDF</b>	Polifluoruro de vinilideno ( <i>PolyVinylDene Fluoride</i> )
<b>SEA</b>	Servicio de Experimentación Animal
<b>SDS-PAGE</b>	<i>Sodium Dodecyl Sulphate-PloyAcrilamide Gel Electrophoresis</i>
<b>Smad</b>	<i>Small protein Mothers Against Decapentaplegic</i>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante $\beta$ ( <i>Transforming Growth Factor beta</i> )
<b>TM</b>	Tricrómico de Masson
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral $\alpha$ ( <i>Tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> )
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular ( <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> )
<b>WT</b>	Genotipo salvaje ( <i>Wild Type</i> )
<b>WVG</b>	Weigert Van-Gieson
<b>ZP (Dominio)</b>	Dominio Zona Pelúcida



## Glosario

<b>Buffer (ingl.)</b>	Solución tamponada
<b>Cluster of differentiation (ingl.)</b>	Moléculas situadas en la superficie celular que sirven como marcadores
<b>Et al. (lat. cient.)</b>	Abreviatura que significa “y colaboradores”
<b>In vitro (lat. cient.)</b>	Experimento realizado en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo
<b>In vivo (lat. cient.)</b>	Experimento realizado en un organismo vivo
<b>Knockout (ingl.)</b>	Ratón al que se le ha eliminado la expresión de ambas copias del gen
<b>Splicing (ingl.)</b>	Proceso transcripcional de corte y empalme de secuencias
<b>Wildtype (ingl.)</b>	Genotipo salvaje





# Introducción



## Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria

La Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (HHT, por sus siglas en inglés, *Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia*) o Síndrome de Rendu-Osler-Weber es una enfermedad genética autosómica dominante cuya prevalencia estimada es de 1 en cada 5000-8000 personas por lo que se considera una enfermedad rara (Shovlin and Letarte, 1999; Bordeau, Dumont and Letarte, 1999).

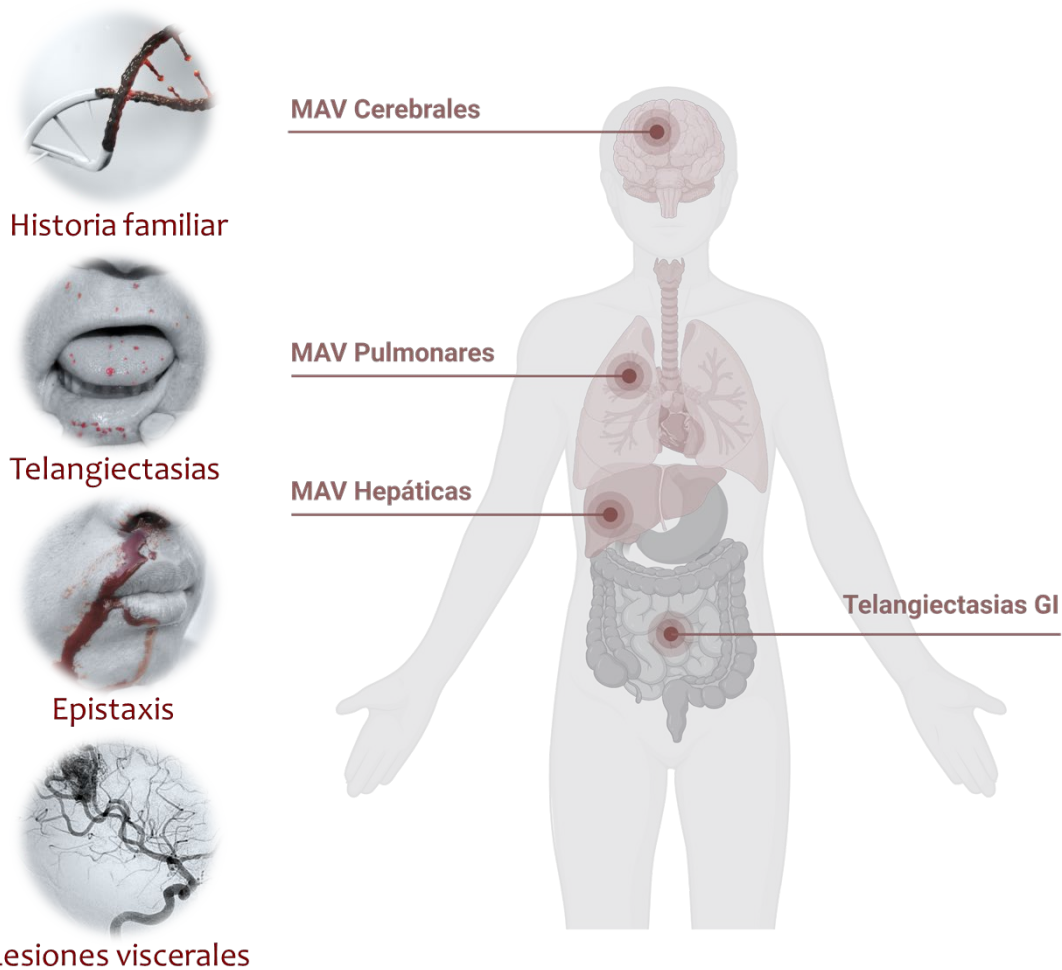
Descrita por primera vez por el Dr. Henry Gawen Sutton en 1864, sin embargo, es Henri Jules Louis Marie Rendu en 1896 quien la reconoce como una enfermedad hemorrágica distinta a la hemofilia, que no se debe a hemorragias por deficiencias en la coagulación sanguínea (Rendu, 1896).

Posteriormente los médicos William B. Osler en 1901 y Frederick Parkes Weber en 1907 publican las primeras descripciones de casos, después de observar los síntomas y características comunes en varias generaciones de una familia afectada. Osler observó y documentó casos de pacientes con telangiectasias en la piel y las membranas mucosas, así como episodios recurrentes de sangrado nasal, sangrado gastrointestinal y otros síntomas relacionados (Osler, 1901; Weber 1907).

El término "telangiectasia hemorrágica hereditaria" fue utilizado por primera vez por el médico Frederic M. Hanes en 1909 (Hanes, 1909).

### 1.1. Manifestaciones clínicas y síntomas

Como manifestaciones típicas de la enfermedad nos encontramos con la epistaxis y las telangiectasias comúnmente localizadas en labios, palmas de las manos, pabellones auriculares, lecho ungueal, paladar, lengua y cara. Existen otras expresiones de la enfermedad, menos comunes y más graves, como son las malformaciones arteriovenosas en diversas localizaciones, como en el aparato digestivo, pulmonar o sistema nervioso (Figura 1) (Peery 1987; Shovlin 2010).



**Figura 1:** Representación esquemática del cuadro clínico de la enfermedad (creada con Biorender.com).

## Epistaxis

La epistaxis o sangrado nasal es el síntoma más frecuente de esta enfermedad, reportado por más del 90% de los pacientes, y suele iniciarse en edades tempranas.

Los pacientes pueden experimentar sangrado nasal espontáneo o desencadenado por diferentes factores. La frecuencia y la intensidad del sangrado pueden variar ampliamente entre los pacientes y se incrementan con la edad. Los sangrados llegan a ser tan graves que en algunos casos los pacientes necesitan transfusiones de sangre repetidas (Begbie, Wallace and Shovlin, 2003; McDonald, Bayrak-Toydemir and Payeritz, 2011; Shovlin *et al.*, 2016).

## Telangiectasias mucocutáneas

Los sangrados nasales mencionados anteriormente, que se originan por la rotura de los vasos sanguíneos de la mucosa nasal, son consecuencia de la presencia de malformaciones vasculares en dicha mucosa.

Las telangiectasias, un subtipo de malformación vascular, pueden aparecer en la mucosa nasal o bucal y en la piel. Como hemos dicho, las de la mucosa son responsables de las epistaxis o sangrados de repetición. En cuanto a las que se originan en la piel, ocurren en cerca del 75% de los pacientes y consisten en pequeñas dilataciones redondas de los vasos capilares, rojizas, en forma de estrella que suelen aparecer entre 5 y 20 años después de las epistaxis y tienden a aumentar en número y tamaño con la edad. Los sitios más comunes de localización de las telangiectasias cutáneas son las palmas de las manos, lecho de las uñas, labios, lengua y cara (Begbie, Wallace and Shovlin 2003; Garg *et al.*, 2014).

## Malformaciones arteriovenosas

Las malformaciones arteriovenosas (MAV), otro subtipo de las malformaciones vasculares, son conexiones anómalas entre arterias y venas que se forman sin la presencia de capilares intermedios. Estas malformaciones pueden afectar a varios órganos, incluyendo el pulmón, el cerebro, el hígado y el tracto gastrointestinal. Los síntomas de las MAV dependen de su ubicación y tamaño, pero pueden incluir dificultad respiratoria, cefaleas, mareos, sangrado gastrointestinal y trastornos neurológicos, como accidentes cerebrovasculares o convulsiones. Las localizaciones más frecuentes de las MAV son los pulmones (15-50%), hígado (31-74%), tracto gastrointestinal (20-70%) y sistema nervioso (9-23%) (Govani and Shovlin, 2009; Donaldson *et al.*, 2015).

## MAV pulmonares

Las malformaciones arteriovenosas pulmonares (MAVP) están presentes en, aproximadamente, entre el 15 y el 50% de los pacientes con HHT. Se asocian predominantemente a la HHT1, aumentando su prevalencia con la edad hasta un 33% en la 5ª década de vida. Las MAVP que ocurren en el contexto de HHT tienen más probabilidades de ser múltiples (35–65% de los casos) y predominan en los lóbulos inferiores de los pulmones (60–95%). Los tipos más frecuentes de MAVP son malformaciones simples y complejas. Las MAVP simples se vascularizan a través de una arteria aferente y una vena eferente, y son la forma más común (hasta 80% de los casos). Las MAVP complejas (65–80%) se vascularizan a través de varias arterias pulmonares segmentarias, y/o presentan un drenaje a través de múltiples venas pulmonares segmentarias (Cottin *et al.*, 2007).

Los pacientes pueden presentar cianosis y disnea a causa de la falta de oxigenación como consecuencia de un cortocircuito entre sangre oxigenada y no oxigenada a nivel pulmonar (Gossage and Kang, 1997).

Se ha visto que este tipo de malformaciones están asociadas con complicaciones incapacitantes y potencialmente mortales, como accidentes cerebrovasculares, absceso cerebral, hemoptisis masiva y hemotórax espontáneo (Cottin *et al.*, 2004; Cottin *et al.*, 2007; Noel *et al.*, 2022).

## MAV Hepáticas

La prevalencia de las malformaciones hepáticas fluctúa entre el 31 y el 74% de los pacientes y se clasifican anatómicamente en telangiectasias, dilatación de la arteria hepática, dilatación de la vena porta y derivaciones entre la arteria hepática y la vena porta, así como entre la arteria y vena hepática y también entre la vena porta y la vena hepática. Dado que no todas estas comunicaciones son entre una arteria y una vena, el término más apropiado para estas lesiones es el de malformaciones vasculares hepáticas (Khalid and Garcia-Tsao 2007).

Dependiendo de su lesión primaria, estas lesiones vasculares pueden presentar diversas complicaciones, que incluyen la insuficiencia cardíaca de alto gasto,

hipertensión portal, necrosis biliar, isquemia biliar, isquemia mesentérica entre otros. Los estudios observacionales muestran que los pacientes con alteración del gen *ACVRL1* son generalmente los más afectados, en especial las mujeres (García-Tsao, 2000; Haahr, 2023).

## MAV Gastrointestinales

Las malformaciones gastrointestinales pueden causar hemorragia digestiva con una prevalencia del 30% en pacientes con HHT y típicamente ocurren entre la quinta y sexta década de vida. Estas malformaciones se encuentran principalmente en forma de telangiectasia en el estómago (46-75%) e intestino delgado (56-91%), concretamente en el duodeno y menos frecuentemente en el colon (30%). Se ha observado un aumento de la incidencia de MAV con la edad y que ocurren principalmente en pacientes con HHT1 (Canzonieri *et al.*, 2014; Noel *et al.*, 2022). El sangrado gastrointestinal crónico se desarrolla en el 30% de los pacientes con HHT y puede ser clínicamente evidente u oculto, siendo su principal consecuencia el desarrollo de anemia ferropénica (Al-Samkari 2021; Kolarich, 2021). Para mantener la anemia controlada, estos pacientes reciben normalmente un tratamiento de ferrotterapia oral y transfusiones de sangre frecuente (Al-Samkari, 2021; 2022).

## MAV en el Sistema Nervioso Central

Existe una gran variedad de malformaciones arteriovenosas cerebrales, cuya prevalencia ronda entre el 9 y el 23% en pacientes con HHT.

Este tipo de lesiones son frecuentemente múltiples y puede haber distintos tipos en un mismo paciente, pudiendo ocurrir tanto en cerebro como en médula espinal. La mayoría de los pacientes presentan síntomas neurológicos inespecíficos, como dolor de cabeza o convulsiones, que son difíciles de controlar, y el 20% de los pacientes presentan hemorragia (Rangel-Castilla *et al.*, 2014; Prado *et al.*, 2019; Drapé *et al.*, 2022).

El diagnóstico de una MAV generalmente se realiza mediante imágenes médicas, como la resonancia magnética o la angiografía cerebral, donde se pueden visualizar los vasos sanguíneos y detectar las anomalías (Storkebaum *et al.*, 2011; Zhu, Zhang and Su, 2016; Faughnan *et al.*, 2020).

## 1.2. Diagnóstico clínico: Criterios de diagnóstico de Curaçao

Definir clínicamente la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria es fundamental para realizar un correcto diagnóstico de la enfermedad que permita identificar tratamientos adecuados. Los criterios de Curaçao son un conjunto de criterios clínicos utilizados para el diagnóstico de la enfermedad de telangiectasia hemorrágica hereditaria. Estos criterios fueron establecidos por la Fundación de HHT en Curaçao en 1999 y se utilizan a nivel internacional para identificar a los individuos que pueden tener esta enfermedad genética (Shovlin *et al.*, 2000; Danesino, Cantarini and Olivieri, 2023).

Al permitir identificar a los pacientes de la enfermedad, facilitan la monitorización regular de las manifestaciones clínicas y el manejo adecuado de las complicaciones. Esto ayuda a prevenir o reducir el impacto de las hemorragias recurrentes y las complicaciones graves asociadas con la HHT, permitiendo mejorar la calidad de vida de los pacientes, reducir la morbimortalidad asociada a la enfermedad y brindar el cuidado médico y genético necesario (Faughnan *et al.*, 2020).

Los criterios de Curaçao se basan en cuatro características principales de la enfermedad de HHT: epistaxis, telangiectasias, presencia de malformaciones arteriovenosas y una historia familiar positiva.

Con respecto a la epistaxis, se tiene que confirmar la presencia de episodios recurrentes de sangrado nasal espontáneo, que pueden ser moderados o severos, ya que la intensidad y frecuencia de los sangrados varían mucho entre pacientes (Begbie, Wallace and Shovlin, 2003). En relación con las telangiectasias, se debe comprobar la presencia de un número mínimo de estas lesiones cutáneas visibles en áreas como los labios, la nariz, las manos o los pies (Shovlin, 2010; McDonald *et*

*al.*, 2011). Otro criterio clínico de la enfermedad es la presencia de malformaciones arteriovenosas. Estas deben encontrarse en los órganos característicos de la enfermedad, como los pulmones, el cerebro, el hígado o la médula espinal y/o también en forma de telangiectasias gastrointestinales. Por último, debe existir una historia familiar positiva, esto es, que haya un pariente de primer grado (padre, hijo o hermano) diagnosticado con HHT según los criterios anteriores. Es importante tener en cuenta que en esta enfermedad la penetrancia aumenta con la edad, por lo que es esencial tener la confirmación mediante un diagnóstico genético (Shovlin, 2010).

Para realizar el diagnóstico de HHT según los criterios de Curaçao, se deben cumplir al menos tres de estos cuatro criterios. Si 3 de los criterios descritos están confirmados el diagnóstico es definitivo. Sin embargo, si solo se cumplen dos criterios, el diagnóstico es posible o hay sospecha de la enfermedad. En caso de cumplirse apenas un criterio, el diagnóstico es improbable (Tabla 1).

No obstante, es importante destacar que estos criterios no son absolutos y pueden variar en función de la edad y otros factores individuales, por lo que, siempre que sea posible, el diagnóstico definitivo debe ser el genético. (Shovlin *et al.*, 2000; Garg *et al.*, 2014).

El diagnóstico de HHT es:	
Definitivo	Si 3 de los criterios están confirmados
Posible o en sospecha	Si 2 de los criterios están confirmados
Improbable	Si hay menos de dos criterios confirmados
Criterios:	
1. Epistaxis	Recurrentes y espontáneas
2. Telangiectasias	Visibles, múltiples y en localizaciones características: Labios, cavidad bucal, dedos y/o nariz
3. Lesiones viscerales	MAV pulmonares, hepáticas, cerebrales o espinales
4. Historia familiar	Un familiar de primer grado diagnosticado con HHT

**Tabla 1:** Representación esquemática de los criterios implicados en el diagnóstico de HHT.

### 1.3. Genética de la enfermedad y clasificación de los pacientes de HHT

En 1994 se identificó el primer gen relacionado con la enfermedad, conocido como endogлина. Posteriormente, se descubrieron otros genes involucrados en la HHT, como *ALK1* y *SMAD4*, que desempeñan un papel crucial en la formación y regulación de los vasos sanguíneos (McDonald et al., 1994; Shovlin et al., 1994).

Cerca del 90% de los pacientes de HHT diagnosticados con base en los criterios de Curaçao tienen mutaciones en alguno de los seis *locus* genéticos descritos a continuación (Tabla 2). La HHT se clasifica en diferentes subtipos genéticos según las mutaciones en los diferentes genes afectados. Los dos principales subtipos de HHT son la HHT1 y HHT2 (Abdalla and Letarte, 2006; Kroon et al., 2018).

Tipo de HHT	Número OMIN	Locus	Gen	Proteína
HHT1	#187300	9q33-34	ENG	Endogлина
HHT2	#600376	12q11-14	ACVRL1	ALK1
HHT3	%601101	5q31.3-32	Desconocido	-
HHT4	%610655	7p14	Desconocido	-
HTJP	#175050	18q21.2	MADH4/SMAD4	Smad4
HHT5	#605210	10q11.22	GDF2/BMP9	GDF2/BMP9

**Tabla 2:** Representación esquemática de los principales genes afectados en HHT.

El subtipo HHT1 está asociado con mutaciones en el gen *ENG*, que codifica la proteína endogлина. Se estima que aproximadamente el 61% de los casos de HHT corresponden a HHT1. Las mutaciones en el gen *ENG* afectan a la formación y función de los vasos sanguíneos, lo que resulta en la aparición de malformaciones vasculares en varios órganos, especialmente en mucosas, la piel, los pulmones, el cerebro y con menos frecuencia en hígado cuando se compara con el subtipo HHT2 (McCallister *et al.*, 1994; McDonald *et al.*, 1994; 2015; Noel *et al.*, 2022).

La HHT2 está asociada con mutaciones en el gen *ACVRL1* (también conocido como *ALK1*), que codifica el receptor de activina tipo 1 (*activine receptor-like kinase 1*) y afecta al 37% de los enfermos. Las mutaciones en *ACVRL1* afectan a la señalización del factor de crecimiento transformante beta ( $TGF-\beta$ ), que regula el desarrollo y mantenimiento de los vasos sanguíneos. Los pacientes con HHT2 también presentan MAV en múltiples órganos, que como hemos dicho anteriormente aparecen con mayor frecuencia en el hígado, y generalmente se asocian con un menor número de lesiones cutáneas en comparación con el subtipo HHT1 (Srinivasan *et al.*, 2003).

Por otro lado, existe una minoría de afectados que tienen la mutación en el gen *MADH4*, localizado en el cromosoma 18, que presentan un síndrome combinado de HHT y poliposis juvenil hereditaria, con un alto riesgo de aparición de tumores malignos en el tracto gastrointestinal a edades precoces, junto con las

manifestaciones típicas de la HHT, como las MAV (Chung, 2015; Danesino, Cantarini and Olivieri, 2023).

Además de estos subtipos principales, más recientemente se han identificado otros genes que pueden estar involucrados en la HHT, como el factor de crecimiento y diferenciación 2 (GDF2, *Growth/Differentiation Factor 2*) también conocido como la proteína morfogénica ósea 9 (BMP9, *Bone Morphogenic Protein 9*) en casos raros de HHT (Balachandar *et al.*, 2021). Se han identificado otros dos locus, uno localizado en la región 31.3-32 del brazo largo del cromosoma 5 (HHT3) y otro en la región 14 del brazo corto del cromosoma 7 (HHT4), potencialmente implicados en la génesis de la enfermedad, aunque todavía no se han identificado los genes causantes y las proteínas afectadas (Cole, 2005; Bayrack-Toydemir *et al.*, 2006).

Conviene subrayar que todos los genes involucrados en la aparición de la enfermedad de HHT codifican proteínas implicadas en la vía de señalización de la superfamilia del TGF- $\beta$ . (Govani and Shovlin, 2009).

Es importante destacar que estos subtipos genéticos de HHT son determinados por pruebas genéticas específicas y un diagnóstico preciso requiere la evaluación clínica por parte de un médico especialista en la enfermedad (Kroon *et al.*, 2018).

#### 1.4. Bases moleculares de la sintomatología de la enfermedad

La comprensión de las bases moleculares de la enfermedad es fundamental para el diagnóstico y el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas.

Como ya se ha señalado, los genes implicados en la etiología de la enfermedad de HHT conocidos hasta el momento son principalmente *ALK1* y endogлина, pero también *SMAD4* y *BMP9*. Estos genes están involucrados en la señalización de la superfamilia del TGF- $\beta$ , que desempeña un papel crucial en el desarrollo y mantenimiento de los vasos sanguíneos (Figura 2).

La familia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) incluye no solo a TGF- $\beta$ , sino también a otros miembros relacionados, como los BMP, activinas, inhibinas y los factores de crecimiento. La superfamilia tiene varias funciones,

incluida la regulación del crecimiento celular, la diferenciación, la apoptosis, la migración y la producción de matriz extracelular.

Por ejemplo, los factores de crecimiento óseo, como el BMP-9 que puede estar mutado en esta enfermedad, desempeñan un papel crucial en la formación y mantenimiento del tejido óseo, estimulando la diferenciación de células osteoblásticas y la mineralización del hueso (Abdalla and Letart, 2006; Pardali, Goumans and Dijke, 2010).

Además, juegan un papel crucial en el desarrollo embrionario, en la homeostasis de los tejidos y en la regulación del sistema inmunitario (Dijke *et al.*, 2008; Akhurst and Hata, 2012). Por ejemplo, al igual que el TGF- $\beta$ , otros miembros de la familia también están implicados en la regulación de la respuesta inmune. Las activinas y las inhibinas modulan la función de células del sistema inmune, como linfocitos, macrófagos y células dendríticas, afectando la producción de citocinas y la respuesta inflamatoria.

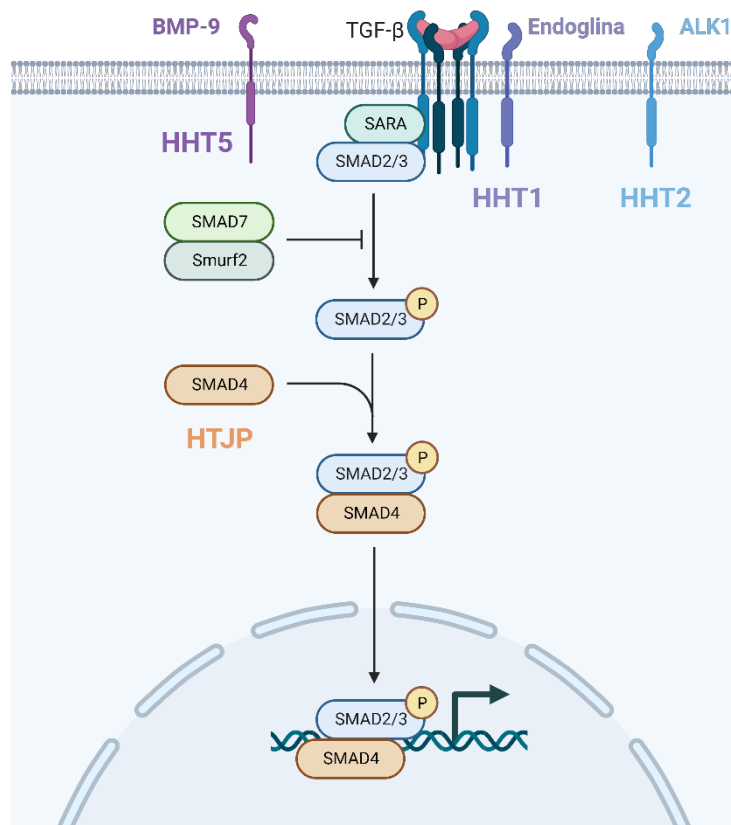
Finalmente, varios miembros de esta familia participan en la regulación de la angiogénesis, el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos. Por ejemplo, los BMP estimulan la angiogénesis en diferentes tejidos y contribuyen a la formación de la red vascular durante el desarrollo embrionario.

Como se ha explicado anteriormente, la mayoría de los casos de HHT son consecuencia de mutaciones en los genes que codifican endoglin y *ALK1*.

Endoglin actúa como receptor auxiliar para diferentes miembros de la superfamilia de factores de crecimiento de TGF- $\beta$  (Dijke *et al.*, 2008, Schoonderwoerd, Goumans and Hawinkels, 2020). Se considera que endoglin tiene un papel importante en la hematopoyesis, angiogénesis, desarrollo cardiovascular y tono vascular. Se expresa predominantemente en células endoteliales, pero también en otros tipos, incluyendo células del músculo liso, mesenquimatosas, células madre hematopoyéticas, monocitos/macrófagos, sinciotrofoblastos y fibroblastos (St-Jacques *et al.*, 1994; Nassiri *et al.*, 2011; Jonker and Arthur, 2001; Rossi *et al.*, 2014; 2016).

ALK1, un receptor de tipo I de TGF- $\beta$ , es una proteína homodimérica transmembrana que tiene una alta expresión en células endoteliales y en tejidos muy vascularizados y aumenta durante los periodos de angiogénesis activa, durante la reparación de heridas y tejidos y en la angiogénesis tumoral (Seki, Yun and Oh, 2003; Mahmoud *et al.*, 2009). Además de su mayoritaria expresión en el endotelio, también se ha descrito que ALK1 se expresa en células esteladas hepáticas, cardiomiocitos, condrocitos, monocitos, células madre de la cresta neural, fibroblastos de piel, microglía y mioblastos (Sanz-Rodríguez *et al.*, 2004; Mancini *et al.*, 2007; Velasco *et al.*, 2008).

Cada miembro de esta familia tiene efectos específicos y su actividad puede variar según el tejido y la etapa del desarrollo en la que se encuentren. En conjunto, estos factores desempeñan un papel crucial en múltiples procesos biológicos, desde el desarrollo embrionario hasta la regulación de la respuesta inmune y la reparación tisular (Pepper, 1997; Pardali, Goumans and Dijke, 2010).



**Figura 2:** Representación esquemática de la ruta de TGF- $\beta$ , sus ligandos y subtipos de la enfermedad de HHT (creada con Biorender.com).

La ruta clásica de señalización del TGF- $\beta$  es una vía de señalización celular altamente regulada que transmite señales desde el receptor de TGF- $\beta$  en la membrana celular hasta el núcleo de la célula, donde se activan genes específicos. Los receptores de TGF- $\beta$  se dividen en tres subfamilias, denominadas receptores de tipo I, tipo II o tipo III (Lebrin *et al.*, 2004; Dijke and Arthur, 2007).

El TGF- $\beta$  se une a un complejo de receptores en la membrana celular, compuesto por un receptor tipo II y un receptor tipo I. Esta unión induce la formación de un complejo receptor activo. La unión del TGF- $\beta$  al complejo de receptores provoca la activación del receptor de TGF- $\beta$  tipo I por parte del receptor de TGF- $\beta$  tipo II. Esto desencadena una serie de eventos en cascada en la vía de señalización.

La activación del receptor tipo I permite la unión y fosforilación de proteínas Smad, que son proteínas reguladoras clave en la vía de señalización del TGF- $\beta$ . Las Smads fosforiladas se asocian con la proteína co-Smad (Smad4) y forman un complejo activado (Cunha *et al.*, 2017; Tzavlaki and Moustakas, 2020).

El complejo Smad/co-Smad activado se transloca al núcleo, donde se asocia con otros factores de transcripción y coactivadores o corepresores para modular la expresión de genes específicos. Esto puede llevar a la activación o represión de la transcripción de diferentes genes, lo que resulta en los diversos efectos biológicos descritos (Figura 2).

Por otra parte, los receptores tipo III son glicoproteínas de membrana que se unen al TGF- $\beta$  y modulan su interacción con los receptores tipo I y tipo II en la superficie celular. Aunque los receptores tipo I y tipo II son necesarios para la activación de la señalización de TGF- $\beta$ , los receptores tipo III actúan como co-receptores, mejorando la afinidad y la especificidad de la unión del TGF- $\beta$  a los receptores tipo I y tipo II, ayudando a modular la señalización intracelular.

Es importante destacar que la vía de señalización del TGF- $\beta$  está altamente regulada y puede variar según el contexto celular y tisular. Además, las alteraciones en esta ruta de señalización pueden estar asociadas con diversas enfermedades, incluyendo cáncer, enfermedades fibroproliferativas y trastornos del desarrollo (Derynck, 1994; Tzavlaki and Moustakas, 2020).

Por otro lado, además de la ruta de señalización clásica a través de las Smads, el TGF- $\beta$  también puede activar vías de señalización no Smad, como las vías MAPK (quinasa activada por mitógenos) y PI3K (fosfatidilinositol 3-quinasa), que pueden influir en respuestas celulares adicionales (Tzavlaki and Moustakas, 2020).

## 2. Malformaciones vasculares en HHT

La Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria se caracteriza por la aparición de diferentes tipos de malformaciones vasculares que causan la sintomatología y la gravedad de la enfermedad. Las complicaciones derivadas de estas conexiones arteriovenosas directas dependen de su ubicación anatómica y la etapa de desarrollo y, como hemos explicado, pueden llegar a poner en riesgo la vida del paciente. Los tratamientos actuales para las telangiectasias o las malformaciones vasculares de las mucosas o de los órganos internos no son efectivos ya que se observa recurrencia en aproximadamente el 25% de los pacientes dentro del primer año posterior a la intervención. La búsqueda de nuevos tratamientos médicos adicionales para las malformaciones vasculares pequeñas, múltiples o difusas sigue siendo de gran interés, ya que en estos casos las intervenciones quirúrgicas no se consideran seguras, técnicamente factibles o efectivas (Fereydooni, Dardik and Nassiri, 2019; Schimmel *et al.*, 2021).

### 2.1. Patogénesis de las malformaciones vasculares en la HHT

La patogénesis de las malformaciones arteriovenosas o malformaciones vasculares no se comprende completamente, pero se cree que es el resultado de un desarrollo anormal de los vasos sanguíneos. Se ha demostrado que ciertas mutaciones genéticas están asociadas con la aparición de MAV en algunos casos. En el contexto de HHT, las mutaciones en los genes *ENG*, *ACVRL1* y *SMAD4* se han asociado con el desarrollo de MAV. El mecanismo exacto por el cual esto ocurre no se comprende por completo, pero se cree que la pérdida de la proteína endoglina o ALK1 del endotelio vascular es un requisito previo para la formación de estas lesiones, ya que conducen al desarrollo y remodelación anormal de los vasos sanguíneos (Mallet *et al.*, 2015; Galaris *et al.*, 2021).

Como hemos explicado, estos genes están involucrados en la regulación de las vías de señalización del TGF- $\beta$ , que desempeña un papel crucial en el desarrollo vascular normal, por lo que se cree que la aparición de las malformaciones es

consecuencia de las alteraciones en la señalización de esta vía (Shovlin and Letarte, 1999; Fernández-L *et al.*, 2006; Atri *et al.*, 2015).

Durante el desarrollo embrionario, los vasos sanguíneos se forman a través de la angiogénesis. Se cree que, en las MAV, hay una deficiencia en la regulación de los factores de crecimiento y en las señales moleculares involucradas en la angiogénesis, lo que lleva a una formación anormal de los vasos sanguíneos y a la falta de desarrollo de capilares normales (Mahmoud *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011).

Los síndromes genéticos de la línea germinal asociados con las MAV se replicaron mediante la eliminación de genes, principalmente en ratones y peces cebra.

Los puntos fuertes de los modelos de ratón de HHT actuales incluyen la capacidad de estudiar los mecanismos subyacentes de la enfermedad, la capacidad de probar terapias potenciales y la capacidad de visualizar la formación de MAV a tiempo real. Estos modelos han proporcionado información valiosa sobre el papel de la endoglina y ALK1 en el desarrollo y mantenimiento vascular, así como la importancia de los desencadenantes angiogénicos en la formación de las MAVs. Además, estos modelos se han utilizado para desarrollar y probar posibles terapias para pacientes con HHT, identificando posibles dianas terapéuticas (Tual-Chalot, Oh and Arthur, 2015; Dingenouts, Goumans and Bakker, 2015).

En estudios iniciales, la pérdida total de los genes *ENG* (*Eng<sup>-/-</sup>*) o *ALK1* (*Alk1<sup>-/-</sup>*) resultó en letalidad embrionaria en ratones debido a alteraciones vasculares incompatibles con la vida, como consecuencia de un desarrollo vascular defectuoso y una asociación deficiente de las células de músculo liso vascular al endotelio. Tanto los sacos vitelinos *Eng<sup>-/-</sup>* como los *Alk1<sup>-/-</sup>* contenían vasos grandes y frágiles. Los embriones *Eng<sup>-/-</sup>* tenían alteraciones en el desarrollo cardíaco y un retraso en la maduración de los vasos principales con menos células musculares lisas vasculares a su alrededor. De manera similar, los embriones *Alk1<sup>-/-</sup>* mostraron una maduración tardía de los vasos. En conclusión, ambas proteínas parecen ser críticas para la angiogénesis y la proteína endoglina necesaria para el desarrollo cardíaco, ya que los ratones presentaban malformaciones en las válvulas

cardíacas y tabicación del corazón. (Li *et al.*, 1999; Arthur *et al.*, 2000; Seki, Yun and Oh, 2003; Atri *et al.*, 2015).

Posteriormente, se generaron ratones heterocigóticos para endogлина y *ALK1*, con un alelo funcional y uno mutado. Se observó que, en estas proteínas, la heterocigosis causa haploinsuficiencia, es decir, una sola copia del gen no es capaz de producir una cantidad normal de proteína, por lo que la cantidad de proteína está reducida. Los ratones *Eng*<sup>+/-</sup> y *Alk1*<sup>+/-</sup>, que por otro lado son el modelo genético de los pacientes de HHT, desarrollaron lesiones vasculares similares a las que ocurren en estos pacientes, entre siete y veinte meses, y entre tres y veinticuatro meses, respectivamente. Curiosamente, las lesiones fueron más frecuentes y prominentes en el fondo genético 129/Ola, lo que implica una relevancia potencial para los modificadores genéticos en la susceptibilidad a la HHT (Torsney *et al.*, 2003; Sugden *et al.*, 2017). Además, estos estudios revelan que las lesiones ocurrieron en menos de la mitad de los animales y de manera impredecible (Srinivasan *et al.*, 2003; Zhu, Zhang and Su, 2016).

Sin embargo, en un estudio desarrollado por Jerkic y sus colaboradores, en el que se utilizó el modelo de angiogénesis *in vivo* con *plugs* de Matrigel®, se observó que estos *plugs* implantados en el lomo de los ratones heterocigotos para endogлина, (*Eng*<sup>+/-</sup>) son infiltrados por una menor cantidad de células endoteliales que los inyectados en ratones control (Jerkic *et al.*, 2006). También se ha demostrado que la neovascularización de la retina tras la retinopatía isquémica inducida por oxígeno en ratones *Eng*<sup>+/-</sup> presenta defectos en la angiogénesis, con pocos o ningún penacho angiogénico (Park *et al.*, 2013).

Es decir, que, aunque la haploinsuficiencia por sí sola no puede explicar la generación localizada de lesiones vasculares en pacientes con HHT, la alteración de los niveles de expresión de endogлина afecta al proceso angiogénico.

Por otro lado, es intrigante que las lesiones vasculares de HHT aparezcan en sitios distintos dentro de ciertos órganos, en lugar de estar presente en todo el cuerpo y en todos los órganos o tejidos. Esta paradoja ha sido explicada, como en muchas

otras enfermedades genéticas, al postular la necesidad de un segundo evento (Ruiz-Llorente *et al.*, 2017; Bernabeu *et al.*, 2020).

Teniendo en cuenta que los ratones KO eran letales, mediante el desarrollo de ratones *knockout* condicionales, se ha demostrado recientemente que la eliminación postnatal de *ALK1*, endogлина o *TβRII*, conlleva el desarrollo de alteraciones en la vasculatura y/o deficiencias en la angiogénesis (Mahmoud *et al.*, 2010; Allison *et al.*, 2012; Tual-Chalot *et al.*, 2014).

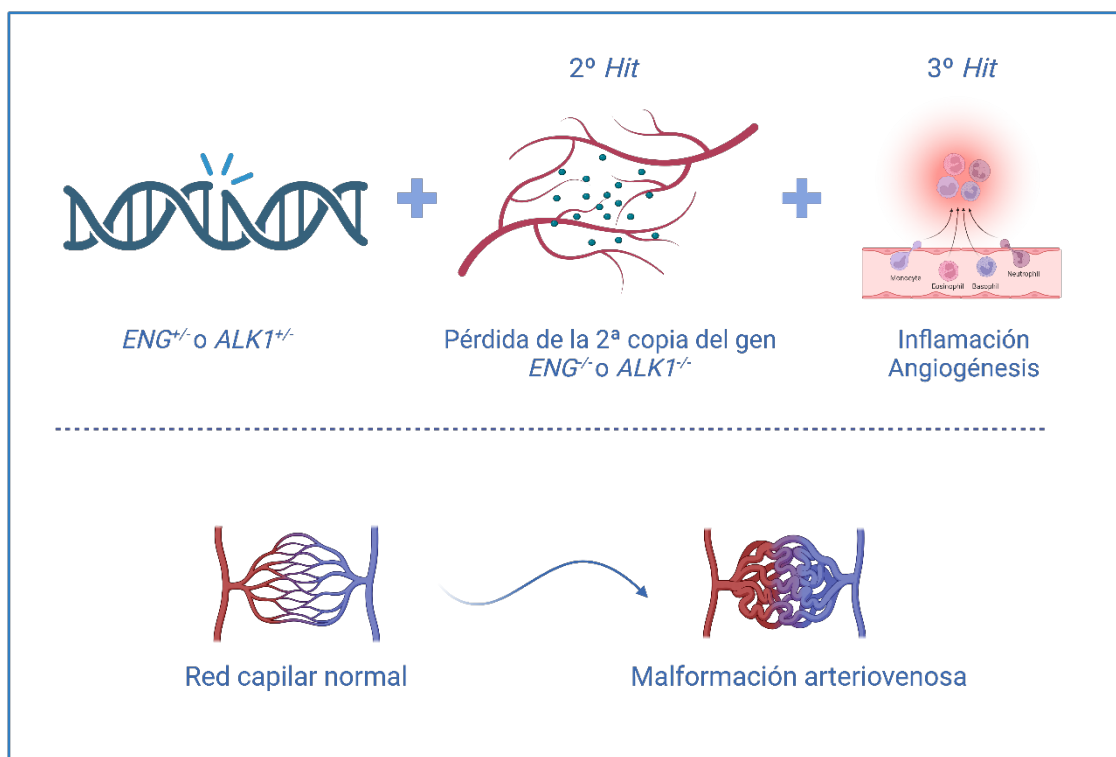
Mahmoud y sus colaboradores en 2010, vieron que la disminución de expresión de endogлина en células endoteliales resulta en un fenotipo claro de malformaciones arteriovenosas en la vasculatura retiniana neonatal que recuerda a las malformaciones vasculares en HHT. Usando ratones *knockout* inducibles para endogлина específicos del endotelio (*Eng-iKOe*), se apreció que las retinas deficientes de endogлина exhibían una remodelación tardía del plexo capilar, una mayor proliferación de células endoteliales y malformaciones arteriovenosas localizadas. Las conexiones arteriovenosas presentaban un fenotipo venoso y se observaba un aumento de la capa muscular probablemente en respuesta a un aumento del flujo sanguíneo (Mahmoud *et al.*, 2010). Esto es similar al fenotipo de aumento de la capa muscular venosa que se observó en las malformaciones arteriovenosas dérmicas en pacientes de HHT (Braverman, Ke and Jacobson, 1990).

Choi y sus colaboradores en 2014, usando el modelo *SM22α-Cre*, que se expresa en células endoteliales y células del músculo liso vascular observaron que estos ratones presentaban MAVs esporádicas y microhemorragias en el cerebro y médula espinal y además un 50% de mortalidad a las 6 semanas. Mientras que en el modelo murino *LysM-Cre* que se expresaba solamente en macrófagos, no han detectado ningún fenotipo (Choi *et al.*, 2014).

Garrido-Martin y sus colaboradores en 2014, han usado un modelo murino *R26-Cre<sup>ER</sup>* que se expresa en todas las células y han observado que la aparición de malformaciones se correlacionaba con un estímulo de VEGF o una herida. Por otro lado, usando el modelo *Scl-Cre<sup>ER</sup>*, que se expresa solamente en células

endoteliales, se ha observado el desarrollo de MAV en la piel tras la generación de una herida cutánea (Garrido-Martin *et al.*, 2014).

Teniendo en cuenta todas las observaciones realizadas en estudios con modelos de ratón iKO, donde se demostró que las manifestaciones clínicas estaban limitadas a sitios donde existía un entorno proangiogénico o inflamatorio, se desarrolló la teoría del tercer evento o “*third hit*”, que dicta que es necesario un estímulo proangiogénico o inflamatorio para desarrollar las manifestaciones clínicas de la enfermedad (Figura 3) (Park *et al.*, 2009; Garrido-Martin *et al.*, 2014; Tual-Chalot, Oh and Arthur, 2015). Es decir, la hipótesis del segundo evento “*second hit*” ha evolucionado a lo largo de los años para explicar cómo múltiples factores, ya sean ambientales o genéticos inducirían la delección de la expresión de la segunda copia del gen. En el caso de la HHT, los desencadenantes externos o fisiológicos, como son la lesión vascular, la inflamación y los estímulos angiogénicos podrían explicar la generación de la MAV. (Arthur *et al.*, 2015; Bernabeu *et al.*, 2020).



**Figura 3:** Representación esquemática de la hipótesis de los tres eventos para la generación de una malformación arteriovenosa en HHT (creada con Biorender.com).

## 2.2. Fisiología e histopatología de las malformaciones arteriovenosas en HHT

La fisiología de las malformaciones arteriovenosas puede variar dependiendo de su localización y tamaño, pero en general se producen tres alteraciones principales. Concretamente, los *shunts* arteriovenosos que se producen debido a la falta de capilares, hacen que la sangre fluya directamente desde las arterias hacia las venas, sin pasar por los lechos capilares. Esto provoca un aumento del flujo sanguíneo y una disminución de la resistencia vascular en la zona afectada. Como resultado, las venas pueden dilatarse y volverse tortuosas (Mattassi, Loose and Vaghi, 2015; Neto and Durans, 2019;).

Además, se genera la hipoxia tisular debido a la ausencia de capilares y a la derivación directa de sangre arterial hacia las venas, reduciendo la oxigenación de los tejidos circundantes.

Por último, se puede producir la insuficiencia cardíaca de alto gasto, ya que, debido al *shunt* arteriovenoso se reducen las resistencias periféricas y el corazón se ve obligado a incrementar el gasto cardíaco para mantener de este modo, regulada la presión arterial. A largo plazo, este incremento del gasto cardíaco puede llevar a una sobrecarga del corazón y a una disminución de la función cardíaca (Mattassi, Loose and Vaghi, 2015; Neto and Durans, 2019;).

Varios estudios sugieren que la formación de una MAV cutánea en HHT surge alrededor de una vénula poscapilar y se compone de tres etapas definidas, concretamente, la dilatación de las vénulas poscapilares, la formación de conexiones entre arteriolas y vénulas y la desaparición del lecho capilar, lo que finalmente conduce a una comunicación directa entre una arteria y una vena (Mattassi, Loose and Vaghi, 2015; Sugden, 2017; Schimmel et al., 2021).

La alta densidad de vasos, el engrosamiento de las paredes de los vasos con una prominente capa de células del músculo liso vascular, la ausencia de glóbulos rojos lumenales vasculares y el alargamiento y la ramificación aleatoria de los vasos se han sugerido como pistas para diagnosticar MAV incipientes (Gupta and Kozakewich, 2011; Valdivielso-Ramos et al., 2020).

Por otro lado, la apariencia histológica de las MAV es muy variable y va desde malformaciones arteriovenosas simples que se observan con mayor frecuencia de forma esporádica y aislada, hasta lesiones más complejas. Las MAV simples suelen estar compuestas por arterias elásticas de gran calibre y venas de paredes gruesas que a menudo se mezclan con lechos de arteriolas, vénulas y capilares, así como con tejido del estroma. Aunque la conexión entre el componente arterial y el venoso no siempre es histológicamente evidente, sus efectos suelen ser característicos. En lesiones bien desarrolladas con derivaciones de mayor grado, las arterias suelen ser tortuosas y de calibre variable, con fragmentación y engrosamiento de las láminas elásticas. Las venas, por otro lado, muestran hiperplasia en la capa íntima y engrosamiento del músculo liso perivascular y fibrosis adventicia debido al flujo arterial turbulento y de alta presión (Schimmel *et al.*, 2021). El espectro de lesiones vasculares en HHT incluye telangiectasias mucocutáneas como, así como MAV viscerales que involucran el pulmón, el hígado, el cerebro y el tracto gastrointestinal. A pesar de que las MAV en el contexto de HHT a menudo son múltiples en número, son histomorfológicamente similares a las MAV esporádicas (Gupta and Kozakewich, 2011; Schimmel *et al.*, 2021).

### 2.3. Tratamientos actuales de la HHT

El mecanismo molecular de la sintomatología de la enfermedad no está definido y además presenta una amplia variabilidad en la gravedad y en su presentación clínica, incluso dentro de la misma familia con mutaciones genéticas idénticas. Esta heterogeneidad dificulta el desarrollo de un tratamiento específico que sea efectivo para todos los pacientes.

Además, la complejidad de las malformaciones arteriovenosas, por su ubicación y tamaño variable entre pacientes, hace que el tratamiento sea desafiante (Shovlin, 2010; Noel *et al.*, 2022).

Al ser una enfermedad rara, la realización de grandes ensayos clínicos y la obtención de datos suficientes para evaluar la eficacia de diferentes enfoques de

tratamiento se ve dificultada. La falta de financiación y apoyo para la investigación específica de la HHT también ha sido un obstáculo en el desarrollo de tratamientos específicos.

Aunque no existe un tratamiento específico y definitivo para la HHT, se han desarrollado enfoques de manejo y tratamiento que se centran en controlar las hemorragias, tratar las complicaciones individuales y mejorar la calidad de vida de los pacientes (Robert *et al.*, 2020; Faughnan *et al.*, 2020).

## Tratamiento de los sangrados nasales

El sangrado nasal es un síntoma común en pacientes con HHT debido a las malformaciones vasculares presentes en la mucosa nasal. El tratamiento de las hemorragias nasales en pacientes con HHT generalmente implica enfoques conservadores y medidas para controlar los episodios hemorrágicos.

Como medida preventiva se aconseja mantener la mucosa nasal hidratada ya que esto puede ayudar a prevenir el sangrado. Esto se puede lograr aplicando ungüentos nasales, sueros o geles que contengan agentes vasoconstrictores, para reducir la intensidad y la frecuencia de las hemorragias nasales, ayudando a contraer los vasos sanguíneos y disminuyendo el flujo de sangre al área afectada (Tunkel *et al.*, 2020).

Por otro lado, cuando se produce una hemorragia nasal, se recomienda aplicar presión en el lado que sangra, abriendo suavemente la fosa nasal contra el tabique nasal durante unos minutos, con el objetivo de detener el sangrado.

Cuando los pacientes no responden a los tratamientos tópicos, se utiliza un tratamiento farmacológico principalmente a base de antifibrinolíticos, tratamientos hormonales o también con terapias antiangiogénicas (Albiñana *et al.*, 2020).

Por lo que se refiere a los antifibrinolíticos, el único medicamento aprobado específicamente para su uso en HHT es el ácido tranexámico. Se ha demostrado que el ácido tranexámico es capaz de reducir en número y severidad las epistaxis (Pérez de Molino *et al.*, 2004; Gaillard *et al.*, 2014; Al-Samkari, 2021).

Con respecto a terapia antiangiogénica, el fármaco que se está usando es el bevacizumab que consiste en un anticuerpo monoclonal que se dirige y neutraliza el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), una proteína clave en la formación de nuevos vasos sanguíneos. Se ha demostrado que los niveles de VEGF son aproximadamente 15 veces más elevados en pacientes con HHT y están implicados en su patogenia. Además, estudios preliminares han demostrado que el bevacizumab puede ayudar a reducir la frecuencia y la gravedad de las epistaxis en pacientes con HHT (Arizmendez, Rudmik and Poetker, 2015; Ardelean and Letarte, 2015; Buscarini *et al.*, 2019).

Por otro lado, otro fármaco propuesto para el tratamiento es la talidomida, que consiste en un fármaco inmunomodulador utilizado principalmente en el tratamiento del mieloma múltiple y que se ha demostrado que regula o baja los niveles de VEGF en pacientes con HHT y mejora la integridad de la pared vascular. Sin embargo, se ha documentado en varios estudios la aparición de eventos adversos, en particular neuropatía persistente, por lo que se ha limitado el uso a largo plazo de este fármaco (Amanzada *et al.*, 2010; Lebrin *et al.*, 2014; Invernizzi *et al.*, 2015).

En relación con las terapias hormonales y antihormonales, se procede a la combinación de estrógeno y progesterona en las dosis utilizadas para la anticoncepción oral visto que este tratamiento puede eliminar el sangrado en la HHT sintomática y podría representar una opción razonable para las mujeres en edad fértil. De manera similar, los moduladores selectivos de los receptores de estrógeno como el tamoxifeno y el raloxifeno pueden tener importancia en el manejo de la epistaxis en mujeres posmenopáusicas (Garg *et al.*, 2014; Albiñana *et al.*, 2010; Zarrabeitia *et al.*, 2016).

En casos más graves, donde el sangrado es frecuente y abundante, se puede considerar el tratamiento con láser. En este procedimiento, se dirige un rayo láser hacia las telangiectasias, sellando los vasos sanguíneos y disminuyendo el riesgo de sangrado (Peng, HL *et al.*, 2015; Thiele *et al.*, 2022).

Cuando las hemorragias nasales son recurrentes y difíciles de controlar, puede ser necesaria una embolización arterial. En este procedimiento, se inserta un catéter en un vaso sanguíneo y se inyectan pequeñas partículas para bloquear el flujo de sangre a las áreas afectadas, lo que ayuda a controlar el sangrado.

Sin embargo, los tratamientos de epistaxis son solamente efectivos de una manera temporal, ya que habitualmente la embolización de los vasos provoca una hipoxia que hace que se generen nuevos vasos que, a causa de la enfermedad, están alterados y se pueden volver a romper con facilidad (Baysal *et al.*, 2019; Feller *et al.*, 2022).

Por esta razón, en casos graves donde no caben otros tratamientos se requiere la oclusión nasal definitiva o técnica de Young (Geisthoff *et al.*, 2015).

### Tratamiento de las lesiones mucocutáneas

Las lesiones mucocutáneas pueden ocasionar hemorragia, pero rara vez tiene relevancia clínica y la principal preocupación es estética. A corto plazo se pueden obtener los beneficios del láser u otras terapias de ablación para tratar este tipo de lesiones. Los láseres de luz pulsada intensa o láseres de colorante pulsado pueden utilizarse para tratar las telangiectasias cutáneas y reducir su apariencia. Además, los bloqueadores beta no selectivos como el propranolol y el timolol también pueden tener algunas propiedades antiangiogénicas relacionadas con la vasoconstricción y la expresión reducida de VEGF, puesto que se ha documentado su efectividad en el tratamiento de los hemangiomas (Garg *et al.*, 2014).

En algunos casos, se está usando una crema cuyo principio activo es el timolol y se ha observado la reducción del volumen y cambio en la coloración de estas lesiones (Begbie, Wallace and Shovlin, 2003; Ardelean and Letarte, 2015).

### Tratamiento de las lesiones y los sangrados gastrointestinales

Para el diagnóstico y tratamiento se emplean procedimientos endoscópicos, y en el caso de que no se identifique el sangrado gastrointestinal se considera la endoscopia con videocápsula (Grève *et al.*, 2009).

La técnica de elección para tratar los sangrados GI es la coagulación endoscópica con plasma de argón de las MAV digestivas. Sin embargo, la coagulación repetida con plasma de argón para las malformaciones arteriovenosas recurrentes en el tracto GI, como principal estrategia de tratamiento, no se recomienda, ya que pueden provocar lesiones iatrogénicas repetidas en la mucosa intestinal.

Para pacientes con sangrado GI leve se recomienda el ácido tranexámico sobre la base de un bajo potencial de daño, aunque existe evidencia limitada de su efectividad (Kjeldsen and Kjeldsen, 2000; Iyer *et al.*, 2018).

En el caso de la presencia de un sangrado gastrointestinal moderado a severo, en aquellos pacientes donde persiste la anemia tras el tratamiento, la administración de terapias antiangiogénicas sistémicas intravenosas, como el bevacizumab, deben ser tomadas en consideración (Van-Tuyl *et al.*, 2007; Floria *et al.*, 2014; Al-Samkari, 2021).

En algunos casos se describe el uso de otros fármacos antiangiogénicos, incluidos los moduladores de los receptores de estrógenos como el tamoxifeno, el raloxifeno o el bazedoxifeno. Se están investigando otras terapias que incluyen pazopanib, pomalidomida y doxiciclina. La evidencia para la mayoría de estos medicamentos es escasa y actualmente se están realizando ensayos más grandes que pueden ayudar a dilucidar la seguridad y la eficacia de estos medicamentos en el sangrado relacionado con la HHT (Canzonieri *et al.*, 2014; Noel *et al.*, 2022).

## Tratamiento de las MAV pulmonares

Las complicaciones neurológicas resultantes de las malformaciones arteriovenosas pulmonares son una causa significativa de morbilidad y mortalidad entre los pacientes con HHT. Por ello, para la detección de las MAV pulmonares se recomienda la realización de una ecocardiografía transtorácica con contraste, que consiste en un procedimiento simple y poco invasivo que proporciona información importante para el diagnóstico y pronóstico de la lesión (Shovlin *et al.*, 2008; Floria *et al.*, 2022).

Tras el diagnóstico de MAVP, se recomienda la embolización, siempre y cuando la arteria aferente de la malformación posea un tamaño superior a 3 mm y se lleva a cabo por un radiólogo intervencionista. En caso de procedimientos con riesgo de bacteriemia, es importante tener en cuenta la profilaxis antibiótica para evitar el riesgo de abscesos cerebrales (Faughnan *et al.*, 2011; Lacombe, 2013; Latif, 2020). Para las MAV pulmonares bilaterales difusas que no responden a otros tratamientos y conllevan un riesgo inherente de muerte, el trasplante pulmonar puede considerarse como una opción terapéutica (Garg *et al.*, 2014; Noel *et al.*, 2022).

### Tratamiento de las MAV hepáticas

La mayoría de los pacientes con malformaciones arteriovenosas hepáticas sintomáticas pueden acceder a tratamiento médico.

Con respecto al tratamiento, se ha utilizado la embolización o la ligadura de la arteria hepática. Sin embargo, la necesidad de realizar varias sesiones de embolización y que la mejoría clínica dura poco tiempo después de esta, y sobre todo la aparición de casos de muerte por fallo hepático agudo, han llevado a que estas técnicas sean desaconsejadas hasta aclarar su seguridad (Faughnan *et al.*, 2011; Buscarini, 2018).

En el caso de pacientes con insuficiencia cardíaca de alto gasto, isquemia biliar, hipertensión portal y MAV hepáticas sintomáticas que no responden a los tratamientos, se considera el trasplante hepático como opción terapéutica (García-Tsao, 2007; Floria *et al.*, 2022).

### Tratamiento de las MAV cerebrales

Existe incertidumbre clínica sobre cómo manejar las malformaciones arteriovenosas cerebrales y las complicaciones derivadas de estas lesiones. Algunos estudios sugieren hacer un seguimiento con pruebas de imagen, concretamente, la resonancia magnética cerebral con y sin contraste y la angiografía, para confirmar el diagnóstico y planificar el tratamiento.

Actualmente, se están utilizando diferentes técnicas, como la resección quirúrgica, la embolización intervencionista, y la ablación radioquirúrgica, dependiendo del tamaño, sintomatología y ubicación de estas lesiones. Al contrario de lo que sucede con las malformaciones arteriovenosas pulmonares, en este caso la embolización por si sola es raramente efectiva. Para lesiones inoperables se recomienda la radiocirugía estereotáctica, aunque la tasa de éxito es baja y depende del tamaño de la MAV.

Hay poca evidencia sobre cuál es la mejor opción, por lo que la decisión a menudo debe ser tomada por un comité multidisciplinario y el paciente debe estar involucrado en el proceso de la toma de decisiones (Faughnan *et al.*, 2011; 2020; Garg *et al.*, 2014; Floria *et al.*, 2022; Noel *et al.*, 2022;).

#### 2.4. Esperanza y calidad de vida de los pacientes de HHT

La esperanza de vida de estos pacientes se ve disminuida con respecto a la población general. Por otro lado, la calidad de vida de un paciente con telangiectasia hemorrágica hereditaria puede verse afectada por los síntomas físicos, los desafíos emocionales y las limitaciones en la vida diaria (Zarrabeitia *et al.*, 2017; Kasthuri *et al.*, 2022; Truc Le *et al.*, 2022).

#### Implicación de las hemorragias en la esperanza de vida de los pacientes

Una de las complicaciones más comunes de la HHT son las hemorragias recurrentes, que pueden ser externas o internas. Estas hemorragias pueden tener un impacto significativo en la esperanza de vida de los pacientes, ya que las hemorragias frecuentes pueden llevar a una pérdida crónica de sangre, lo que puede resultar en anemia y debilidad. La anemia crónica puede afectar a la capacidad del cuerpo para transportar oxígeno a los tejidos y órganos, lo que puede llevar a fatiga, dificultad para respirar y debilitamiento general del organismo (Shovlin, 2016; Kritharis, 2018).

Las epistaxis recurrentes, y principalmente la duración de sus episodios ha revelado tener un impacto significativo en la calidad de vida del paciente, ya que más del 90% sufre de ello. Las limitaciones físicas y la preocupación constante por las hemorragias pueden generar ansiedad, depresión y estrés emocional. Además, los pacientes pueden tener que hacer ajustes en su vida diaria para manejar las hemorragias, lo que puede afectar su bienestar general (Merlo *et al.*, 2014; Kasthuri *et al.*, 2022).

Además, como se ha comentado anteriormente, en algunos casos, las hemorragias pueden ser graves y potencialmente mortales.

Por otra parte, las hemorragias recurrentes pueden llevar a complicaciones adicionales. Por ejemplo, las transfusiones sanguíneas frecuentes pueden aumentar el riesgo de infecciones transmitidas por la sangre. Igualmente, los tratamientos necesarios para controlar las hemorragias, como la cauterización de las telangiectasias o la embolización de los vasos sanguíneos anormales, conllevan riesgos inherentes (Zhitnitsky and Gilde, 2022).

En resumen, las hemorragias recurrentes son una de las principales complicaciones de la telangiectasia hemorrágica hereditaria y pueden tener un impacto significativo en la esperanza de vida de los pacientes.

El manejo adecuado de las hemorragias en la HHT es esencial para mejorar la esperanza de vida de los pacientes. Esto implica un enfoque multidisciplinario que incluye la identificación y control de las lesiones vasculares, el manejo de las complicaciones asociadas, la prevención de las hemorragias y el tratamiento de la anemia. Además, es fundamental contar con un seguimiento médico regular para detectar y tratar cualquier complicación de manera temprana (Ingrand *et al.*, 2011).

## Implicación de las MAV en la esperanza de vida de los pacientes

Las malformaciones arteriovenosas pueden provocar una serie de complicaciones y afectar significativamente la calidad de vida de los pacientes. Estudios previos muestran que estos pacientes presentan un deterioro de la calidad de vida a nivel psicológico y en todos los dominios relacionados con la salud (Garg *et al.*, 2014; Droegue *et al.*, 2018).

En general, las MAV pueden poner en riesgo la vida de los pacientes debido a las complicaciones asociadas, como hemorragias cerebrales, insuficiencia hepática y problemas respiratorios. Sin embargo, es importante destacar que el impacto en la esperanza de vida puede variar ampliamente según la ubicación, el tamaño y la gravedad de las MAV en cada paciente de forma individual (Sabba *et al.*, 2006; Gussem *et al.*, 2016).

Una de las áreas más afectadas por las MAV en los pacientes con HHT es el sistema respiratorio. Las MAV en los pulmones pueden causar sangrado recurrente y dificultar la función respiratoria. La presencia de sangrado en los pulmones puede provocar anemia crónica y debilidad, y en casos graves, puede llevar a insuficiencia respiratoria y poner en peligro la vida del paciente. Los síntomas asociados con esta complicación incluyen tos con sangre, dificultad para respirar, fatiga y palpitaciones. Estos problemas respiratorios pueden restringir la capacidad física de los pacientes, dificultando la realización de actividades diarias y limitando su participación en actividades físicas o deportivas (Blivet *et al.*, 2014; Noel *et al.*, 2022).

Además de los problemas respiratorios, las MAV cerebrales son otra complicación grave de la HHT. Estas malformaciones pueden provocar hemorragias cerebrales, accidentes cerebrovasculares y convulsiones. Los síntomas neurológicos asociados, como dolores de cabeza recurrentes, mareos y trastornos del equilibrio, pueden afectar la capacidad de los pacientes para realizar tareas cotidianas, su concentración y su capacidad para trabajar o estudiar. Las complicaciones cerebrales también pueden tener un impacto significativo en la

salud mental de los pacientes, causando ansiedad, depresión y cambios en la personalidad, o incluso causar daños neurológicos permanentes (Lacomb *et al.*, 2013; Thompson *et al.*, 2021; Noel *et al.*, 2022).

Además de los pulmones y el cerebro, las MAV hepáticas pueden afectar el funcionamiento del hígado. Estas malformaciones pueden causar insuficiencia hepática, hipertensión portal y acumulación de toxinas en el cuerpo. Los síntomas asociados incluyen dolor abdominal, ascitis, ictericia y trastornos de la coagulación. Estas complicaciones pueden afectar la digestión, el metabolismo de los nutrientes y la desintoxicación del cuerpo, lo que a su vez puede tener un impacto negativo en la calidad de vida de los pacientes (García-Tsao, 2000; Buscarini *et al.*, 2018; Noel *et al.*, 2022).

Por último, las MAV cutáneas, que se manifiestan como manchas rojas o violetas en la piel, pueden afectar la apariencia física de los pacientes y provocar síntomas incómodos, como picazón, dolor y sangrado. Estas manifestaciones cutáneas pueden tener un impacto psicológico significativo en los pacientes, causando angustia emocional, baja autoestima y dificultades en las interacciones sociales. Además, el sangrado recurrente de las lesiones cutáneas puede provocar anemia y fatiga (McDonald and Stevenson, 2000).

En general, las malformaciones arteriovenosas en la HHT tienen un impacto profundo en la calidad de vida de los pacientes. Los síntomas asociados, como sangrado recurrente, dolor, fatiga y dificultades funcionales, pueden limitar la capacidad de los pacientes para llevar una vida normal y participar en actividades cotidianas. Además, las complicaciones cerebrales y hepáticas pueden poner en peligro la vida de los pacientes y requerir intervenciones médicas y quirúrgicas urgentes. Es importante destacar que cada paciente con HHT puede experimentar una combinación única de síntomas y complicaciones, y el grado de afectación puede variar ampliamente. La detección temprana y el tratamiento adecuado de las MAV son esenciales para prevenir complicaciones graves y mejorar la esperanza de vida de los pacientes, así como, reducir la morbilidad y mortalidad (Ingrand *et al.*, 2011).

(El resto del contenido no está aún disponible para su lectura debido a que se encuentra en trámites de solicitud de patente. Será publicado una vez obtenida la autorización pertinente.)



# Hipótesis y Objetivos



## Hipótesis

Nuestra hipótesis es que [REDACTED] podrían ser una terapia efectiva para evitar el desarrollo, o la gravedad, de las malformaciones vasculares que presentan los pacientes de HHT y que dan lugar a sus síntomas clínicos. Este efecto se debería [REDACTED]

Para poder comprobar esta hipótesis, es necesario disponer de un modelo murino de desarrollo de malformaciones arteriovenosas que sea reproducible y medible. En este sentido, nuestra hipótesis es que el proceso de cicatrización en ausencia de expresión de alguno de los genes causantes de la enfermedad (endoglin o *ALK1*) generaría las condiciones necesarias para que los vasos sanguíneos formados puedan ser anómalos y equivalentes a malformaciones arteriovenosas. Por ello, realizar un modelo de heridas cutáneas en la espalda de ratones *Eng*<sup>-/-</sup> provocaría la formación de malformaciones arteriovenosas que podríamos detectar y medir tiñendo los vasos sanguíneos de la zona.

## Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es analizar el efecto del tratamiento [REDACTED] sobre la aparición y gravedad de malformaciones vasculares en un modelo murino de desarrollo de malformaciones vasculares.

## Objetivos específicos

Para desarrollar el objetivo general planteado en esta tesis doctoral proponemos los siguientes objetivos específicos:

1. Poner a punto un modelo de desarrollo de malformaciones vasculares reproducible y medible.
2. Estudiar el efecto del tratamiento con [REDACTED] sobre la aparición y gravedad de las MAV.
3. Analizar el efecto del tratamiento con [REDACTED] en el microambiente inmune en la zona de desarrollo de las MAV.





# *Materiales y métodos*



Los reactivos, anticuerpos, materiales, equipos y programas informáticos empleados para la realización de esta tesis doctoral están recogidos en las Tablas 4-9 situadas al final del apartado de “Materiales y Métodos”.

## 1. Animales de experimentación

Los ratones descritos en este trabajo tienen fondo genético C57BL/6J. Los experimentos se han realizado en ratones *knockout* condicionales para el gen *Eng* (de aquí en adelante denominados: iKO-*Eng*) que sería un modelo genético del subtipo 1 de la enfermedad Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (HHT1).

Todos los procedimientos se han realizado en paralelo con la línea de ratones descrita y sus controles, en todos los casos se han utilizado grupos con mezcla de ratones macho y hembra, de 3 a 12 meses de edad.

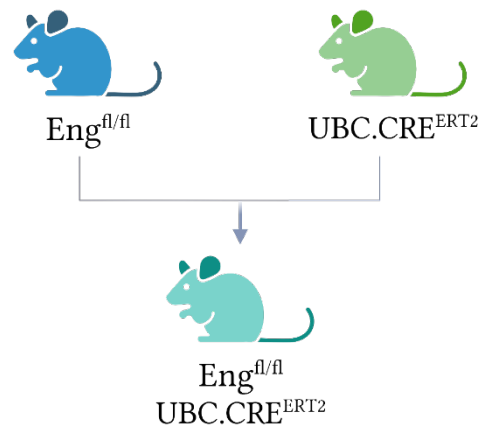
### 1.1. Modelo de ratón HHT1. Ratones *knockout* condicionales de endoglina

Para generar el ratón *knockout* condicional de endoglina inducido por tamoxifeno, se cruzaron dos líneas transgénicas diferentes generadas en la cepa C57BL/6: *Eng<sup>fl/fl</sup>* y la línea UBC.Cre<sup>ERT2</sup>. La línea *Eng<sup>fl/fl</sup>*, que fue generada y cedida por el laboratorio de la Dra. Helen M. Arthur (University of Newcastle, Reino Unido), presenta los exones 5 y 6 de endoglina flanqueados por secuencias loxP (dianas de la recombinasa Cre). Los ratones homocigotos para el alelo de endoglina floxeado (*Eng<sup>fl/fl</sup>*) tienen una esperanza de vida, fertilidad y apariencia normal (Allinson *et al.*, 2007).

La línea UBC.Cre<sup>ERT2</sup> fue cedida por la Dra. Elena Llano (Universidad de Salamanca). Estos ratones transgénicos expresan un gen de fusión Cre<sup>ERT2</sup> bajo el control del promotor de la ubiquitina C humana (UBC). Estos ratones son viables y fértiles. Los ratones de esta línea fundadora tienen una fuerte actividad Cre inducible por tamoxifeno en todos los tipos de tejido. La proteína de fusión Cre<sup>ERT2</sup> consta de una Cre recombinasa fusionada con una forma triple mutante del receptor de estrógeno humano; que no se une a su ligando natural (17β-estradiol) en

concentraciones fisiológicas, pero se unirá a los ligandos sintéticos del receptor de estrógenos 4-Hidroxitamoxifeno y, con menor sensibilidad, ICI 182780. Restringido al citoplasma, Cre<sup>ERT2</sup> solo puede acceder al compartimiento nuclear después de la exposición a 4-Hidroxitamoxifeno. Cuando estos ratones Cre<sup>ERT2</sup> se cruzan con ratones que contienen una secuencia de interés flanqueada por loxP, la recombinación mediada por la recombinasa Cre inducible por tamoxifeno provoca la eliminación de las secuencias flanqueadas en todos los tipos de tejido (Figura 8).

Los ratones *Eng*<sup>fl/fl</sup> se cruzaron con la cepa UBC.Cre<sup>ERT2</sup> para generar un ratón deficiente en endogлина en todos los tejidos tras el tratamiento con tamoxifeno. Los individuos heterocigotos de la primera camada (F1) que contenían el gen de endogлина con las secuencias loxP (*Eng*<sup>wt/fl</sup>) y el transgén Cre (UBC.Cre<sup>ERT2+</sup>) fueron identificados mediante PCR y cruzados entre ellos durante 10 generaciones seleccionando los individuos *Eng*<sup>fl/fl</sup> x UBC.CRE<sup>ERT2</sup> para mantener los cruces.



**Figura 4:** Representación esquemática de las cepas utilizadas para generar un ratón **knockout ubicuo inducible condicional de endogлина**. La cepa que expresa la recombinasa Cre ubicua (Jackson Laboratory). Esta cepa se cruzó con una cepa C57BL/6 que presentaba el gen *Eng* con las dianas loxP flanqueando los exones 5-6. Los ratones heterocigotos para el alelo floxeado de endogлина (*Eng*<sup>fl</sup>) y portadores de la recombinasa Cre de las primeras camadas, fueron identificados mediante PCR y cruzados entre ellos hasta obtener los tres genotipos utilizados en los ensayos.

Con la finalidad de generar el ratón *Eng<sup>fl</sup>*, se indujo la inactivación del gen de endoglina, y consecutivamente la expresión de su proteína, mediante el tratamiento con tamoxifeno de los ratones descritos previamente. Para ello, los ratones se trataron durante cinco días consecutivos con 100 µL de tamoxifeno intraperitoneal (10 mg/mL).

La solución de tamoxifeno se preparó diluyendo 100 mg de tamoxifeno (T5648, Sigma) en 1 mL de etanol al 99% y luego se añaden 9 mL de aceite de girasol para obtener la concentración de 10 mg/mL. Se deja en un baño de 37°C durante 2-3 horas para que se disuelva bien y se guarda a -20°C hasta su uso.

## 1.2. Determinación del genotipo de animales

El genotipo de los ratones se determinó mediante la técnica de Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés de *Polymerase chain reaction*), para ello, en el momento del destete y tras la administración de tamoxifeno, se digirió una pequeña porción del extremo de la cola de los ratones en tampón de lisis durante 24 horas a 55°C. Después se colocaron en un baño seco a 95°C durante 10 minutos y se centrifugó a 12400g durante 10 minutos. El sobrenadante de la digestión, que contiene el DNA genómico del tejido, se empleó para amplificar una región específica para cada uno de los genes de interés. Para ello, se utilizaron unos cebadores específicos de cada uno de los genes, DNA polimerasa, desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTP) y el tampón de reacción.

Una PCR diseñada con 2 cebadores denominados Y y Z nos permite distinguir entre dos genotipos constituidos por dos alelos de endoglina diferentes: *Eng<sup>wt</sup>* con un tamaño de 411 pb y *Eng<sup>fl</sup>* con un tamaño de 566 pb (Figura 9).

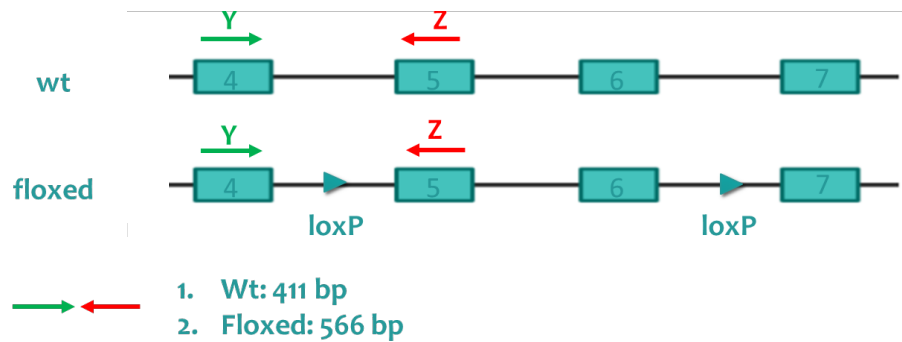
Los cebadores Y y Z están descritos en Allinson y colaboradores (Allison *et al.*, 2007), y representados en la tabla 3. Finalmente, comprobamos la presencia del gen de la recombinasa Cre bajo control del promotor Ubiquitina C humana con dos cebadores específicos (Cre Fw y Cre Rv) que dan lugar a un producto de amplificación por PCR de 420 pb (Tabla 3).

Todas las reacciones de PCR se realizan con un paso previo de desnaturalización durante 2 minutos a 94°C, seguido de un ciclo a 94° durante 30 segundos y 35 ciclos con las siguientes características: 30 segundos a 58°C en la fase de anillamiento de los cebadores YZ y de los oligonucleótidos Cre Fw y Cre R, una fase a 68°C durante 2 minutos y 30 segundos para la elongación y para finalizar, se somete a un ciclo de extensión final a 68°C durante 5 min. Esta reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador (*MyCycler*, Biorad).

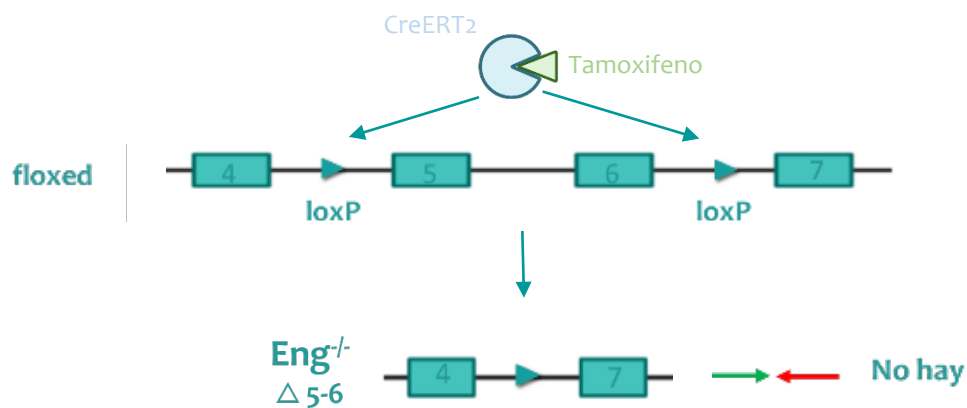
Todos los productos de la PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2% en solución TBE. Los productos de amplificación se visualizaron en el sistema de transiluminación Molecular Imager® GelDoc™ (BioRad, Hercules, CA) y las imágenes se capturaron con el software QuantityOne (BioRad, Hercules, CA).

Nombre del cebador	Secuencia 5' a 3'	Temperatura de anillamiento (° C)
Y	GTCAGCCAGTCTAGCCAAG	63,9
Z	GTGGTTGCCATTCAAGTGTG	64,1
Cre Fw	AGGTGTAGAGAAGGCACTTAGC	60,5
Cre Rv	CTAATCGCCATCTTCCAGCAGG	68,7

**Tabla 3:** Descripción de cebadores utilizados para el genotipado de los ratones.



### Tratamiento con Tamoxifeno



**Figura 5: Representación esquemática del lugar de hibridación de los cebadores Y y Z sobre *Eng*.** En la figura están representados los lugares de hibridación de los cebadores Y y Z sobre la secuencia de *eng* mediante una flecha que indica la orientación 5' – 3' de los mismos. El producto de PCR resultante de la amplificación con los oligonucleótidos YZ dará lugar a un fragmento de 411 pb en el alelo de *Eng*<sup>wt</sup> y de 566 pb en el alelo de *Eng*<sup>fl</sup>. El triángulo verde muestra la localización de las secuencias LoxP en los intrones 4 y 6. Tras el tratamiento con tamoxifeno, la recombinasa cre se activa y actúa sobre las secuencias LoxP eliminando los exones 5 y 6.

### 1.3. Mantenimiento y manipulación de los animales

Los animales se mantuvieron en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la plataforma NUCLEUS de la USAL, en un animalario con barrera libre de patógenos (SPF, del inglés *Specific Pathogen Free*) y condiciones ambientales controladas, a 20°C de temperatura, 60% de humedad ambiental y 12 horas de fotoperiodo. Todos los animales tuvieron acceso libre a agua y comida estándar.

La manipulación, cuidados y utilización de los animales de experimentación se realizaron siguiendo la normativa expuesta en la Directiva Europea 2010/63/UE, la Ley del Estado Español 32/2007 de cuidado de los animales y los Reales Decretos RC1201/2005 y RD 53/2013 por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos. Todos los procedimientos experimentales realizados en animales de experimentación utilizados en este trabajo fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca (número de proyecto 505).

Todos los animales se llevaron a término tras realizar cada uno de los procedimientos definidos en este trabajo, a excepción del procedimiento de generación de heridas cutáneas. Ésta es una técnica de experimentación con grado de sufrimiento leve, ya que la recuperación de los ratones tras esta técnica es rápida y poco dolorosa.

El sacrificio de los animales se llevó a cabo siguiendo las guías para la eutanasia de los animales de experimentación detalladas en el Anexo III del RD 53/2013, basadas en el reglamento 1099/2009 del Consejo Europeo. Además, utilizamos como referencia las recomendaciones dictadas por la Asociación Médica de Veterinaria Americana (AVMA, del inglés *American Veterinary Medical Association*). En todos los casos se llevó a cabo la eutanasia del animal por dislocación cervical, siempre antes de que se despierten del estado de anestesia, para evitar cualquier sufrimiento al ratón, con la única excepción de los ratones sacrificados mediante la perfusión de suero salino heparinizado seguido de látex.

En este caso, los ratones se sacrificaron mediante una dosis límite de pentobarbital tras una administración intraperitoneal basada en el peso del ratón.

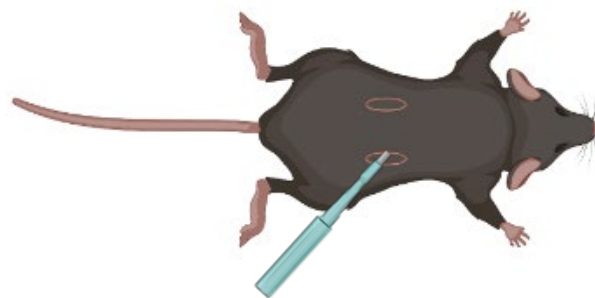
2.

(El resto del contenido no está aún disponible para su lectura debido a que se encuentra en trámites de solicitud de patente. Será publicado una vez obtenida la autorización pertinente.)

### 3. Experimentos *in vivo*

#### 3.1. Generación de heridas cutáneas

Para realizar las heridas, se anestesiaron a los animales por vía inhalatoria con isoflurano en flujo de oxígeno y se mantuvo su temperatura corporal durante todo el proceso con una manta eléctrica. En primer lugar, se colocó al ratón en posición decúbito prono y se rasuró el pelo del lomo. A continuación, se desinfectó la zona de interés con Betadine y se realizó una herida doble en la espalda mediante un punch de biopsia de 5 mm de diámetro. Finalmente, se colocó al ratón en una jaula limpia para que se recuperase de la anestesia y del procedimiento (Figura 11).



**Figura 6:** Representación esquemática de la generación de las dos heridas en el lomo del ratón mediante un punch de biopsia de 5 mm.

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

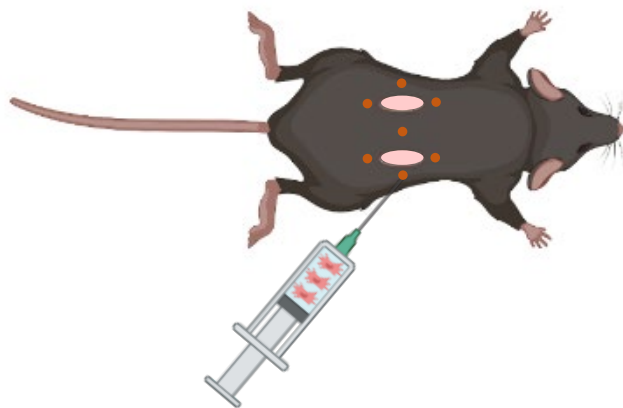
[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

El Matrigel™ (*Matrigel Basement Membrane Matrix Phenol Red-free*) es una preparación de membrana basal solubilizada extraída de sarcoma murino Engelbreth-Holm-Swarm, un tumor rico en proteína de la matriz extracelular como la laminina, el colágeno IV, el heparán-sulfato proteoglicano, la entactina/nidógeno y una gran cantidad de factores de crecimiento. Presenta la peculiaridad de ser líquido a 4°C y polimerizar a partir de 22°C, adquiriendo la textura de gel. Para la inyección se utilizaron jeringas de 1 mL y agujas de calibre 27 (27G). [REDACTED]

[REDACTED]



**Figura 7:** Representación esquemática de los puntos de administración [REDACTED] en las heridas cutáneas previamente generadas.

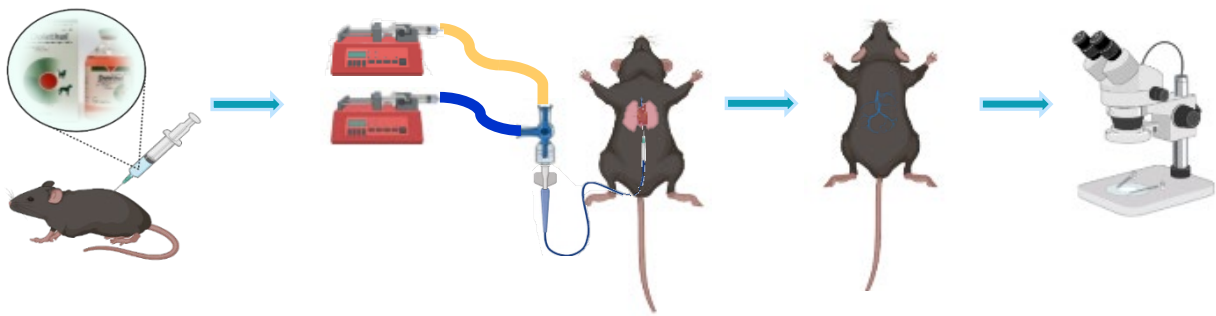
### 3.2. Perfusión de la vasculatura del ratón con látex azul

Diez días tras haber generado las heridas dobles en el lomo del ratón, se pesó cada ratón y se calculó la dosis límite de pentobarbital (30-50  $\mu\text{g/g}$  de ratón) a administrar. Preparamos dos jeringas, una con la solución de suero salino heparinizado, a la cual se le añade nitroprusiato como vasodilatador, y la otra jeringa con el látex azul que permitirá visualizar los vasos. Las bombas de perfusión se programaron para que bombeen las soluciones a la velocidad normal de la sangre (1 mL/min). Tras comprobar que el ratón estuviera bien anestesiado, se colocó al ratón inmovilizado en posición decúbito supino y se abrió la cavidad torácica exponiendo la caja torácica. A continuación, se realizó la perfusión del animal con solución salina. Para ello se introduce la aguja 23G con el catéter en el ventrículo izquierdo del corazón y se enciende la bomba y la llave correspondiente a la jeringa con la solución salina. Posteriormente, se realiza una incisión en la aurícula derecha para que salga la sangre. Se deja circular la solución salina heparinizada hasta que se vea que ya no sale sangre y se cierra la bomba.

Tras la perfusión con solución salina y vasodilatadores, se procedió a la perfusión con látex mediante otra bomba de perfusión que se dejó circular mientras se observaba que el látex alcanzaba los pequeños capilares. Cuando el látex ha llegado a todas las extremidades se cierra la bomba. En este momento, se procedió a aislar el tejido de interés, en este caso la zona de la espalda que contiene las heridas generadas previamente.

Los tejidos recogidos se colocaron entre papeles de filtro identificados y para que se mantuvieran estirados y se fijaron durante 24 horas en formaldehído al 4%.

Tras comprobar que las muestras estaban correctamente fijadas, se procesaron mediante concentraciones crecientes de etanol (70-96%) durante varias horas y, finalmente, se aclararon en la solución de *HistoClear*<sup>TM</sup> para que se pudieran observar en la lupa estereoscópica (Figura 13).



**Figura 8:** Representación esquemática del método de perfusión de látex mediante bombas de perfusión con previa anestesia con pentobarbital seguida de recogida de la zona de la espalda con las heridas generadas.

#### 4. Western Blot

Para comprobar la pérdida de la proteína endoglina en nuestro modelo de ratón tras la administración de tamoxifeno se empleó la técnica de Western Blot.

El método del Western Blot permite la identificación de proteínas de un extracto celular o tejido. Se basa en la separación de las proteínas de una muestra en un gel de poliacrilamida en función de su tamaño, y su posterior transferencia a una membrana. En dicha membrana son reconocidas mediante la utilización de anticuerpos específicos contra las proteínas que se desean identificar (anticuerpos primarios), y anticuerpos secundarios, que reaccionan con los anticuerpos primarios, produce una reacción fácilmente detectable y proporcional a la cantidad de proteína de la muestra.

Para la extracción de proteínas de tejido, se pulverizaron los tejidos, corazón, hígado, pulmón y riñón, en hielo seco y se pesaron 20-30 mg del pulverizado. Se lisó el tejido con 200  $\mu$ L de tampón de lisis (Tris base 20 mM, pH 7,5; NaCl 140 mM, EDTA 50 mM, glicerol al 10% e IGEPAL CA-630 al 1%), en frío, al que se añadieron inhibidores de proteasas y fosfatasa. Se lisó la muestra mediante la acción de un homogeneizador (Ultra-Turrax). Seguidamente, se centrifugaron los lisados obtenidos a 20000g durante 15 minutos a 4°C, se recogieron los sobrenadantes (extractos de proteínas) y se congelaron a -20°C hasta su uso.

La concentración de proteínas de la muestra se determinó utilizando el kit comercial colorimétrico *DC™ Protein Assay* (BioRad), basado en el método de Lowry (Lowry et al, 1951). Este método consiste en hacer reaccionar la proteína con cobre en un medio alcalino. Después, esta proteína llevará a cabo la reducción del reactivo de Folin. Como consecuencia se produce un color azul que es fácilmente cuantificable midiéndolo con una longitud de onda máxima de 750 nm y una mínima de 405 nm.

Para ello, en las muestras de tejido se hizo previamente una dilución 1:8 en tampón de lisis. Se hizo reaccionar la muestra de cada uno de los extractos proteicos, así como de cada uno de los puntos de la recta patrón, obtenida mediante dilución seriada de una solución de 2 mg/mL de BSA en tampón de lisis, con los reactivos del Kit. Se midió la absorbancia de cada uno de los productos de la reacción a 750 nm en un espectrofotómetro *BioTek Epoch*. Los valores de absorbancia de las muestras se extrapolaron en la recta patrón utilizando el *software Gen 5*. Tras la cuantificación se conservó el extracto a -20°C.

Para comparar la expresión de la proteína de interés, se prepararon las muestras de forma que todas tuvieran la misma cantidad de proteína total. En este trabajo, se prepararon 30 µg de proteína por muestra con un tampón de carga (Tris 125 mM, glicerol al 10%, SDS al 2%, β-mercaptoetanol al 1% y azul de bromofenol al 0,0005%; pH 6,8). Para que las proteínas pierdan su estructura terciaria y cuaternaria, las muestras se desnaturalizaron hirviéndolas a 100°C durante 5 min. Las proteínas se separaron mediante una electroforesis vertical en gel, o SDS-PAGE (del inglés, *Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*). Los geles se preparan en el laboratorio a una concentración del 12% de acrilamida. Se cargaron las muestras en cada pocillo y con el fin de identificar las bandas se cargó 4 µL del marcador de peso molecular *Precision Plus Protein™ All Blue Standards* (BioRad), que contiene proteínas de pesos moleculares conocidos. El gel se sometió a la electroforesis en cubetas Mini-Protean®III, sumergido en tampón de electroforesis Tris/Glycine/SDS (Bio-Rad), aplicando un voltaje constante durante 15 minutos a 80 V y seguidamente 60 minutos a 200 V.

En la preparación de los geles utilizados, se añadió 2,2,2-Trichloroethanol (Sigma-Aldrich). El compuesto trihalo modifica los residuos de triptófano en la proteína mediante una modificación covalente, generando una señal de fluorescencia. La señal se visualiza mediante excitación UV. Esto permite, tras una breve fotoactivación, visualizar las proteínas y utilizar la cantidad total de proteína como control de carga (*Stain Free*).

Las proteínas se transfirieron del gel a una membrana de PVDF mediante transferencia húmeda en hielo, durante 1 hora a 400 mA. Para ello, se usó el sistema Mini Trans-Blot® Cell de Biorad, en el que el gel y la membrana (*Immun-Blot Low Fluorescence PVDF Membrane*, BioRad) se ponen en forma de sándwich entre la esponja y el papel (esponja/ papel de filtro/ gel/membrana/papel de filtro/esponja). El sándwich se sumerge en el buffer de transferencia (Buffer Tris-Glicina, Biorad), al cual se le aplica un campo eléctrico. Las proteínas cargadas negativamente viajan a través del gel hacia el electrodo cargado positivamente, hasta que la membrana las detiene.

Una vez acabada la transferencia se analizó la cantidad total de proteína gracias al *Stain free* en un ChemiDoc (Bio-Rad).

Previamente a la incubación con anticuerpos, se procedió al bloqueo de los lugares de la membrana no ocupados por las proteínas. Para ello, una vez finalizada la transferencia se lavó la membrana con tampón de lavado (Tween™<sub>20</sub> al 0,1%, NaCl 150 mM, Tris 20 mM, pH 7,5) y se incubó con una solución de bloqueo de BSA al 5% en TBS (NaCl 5 M, Tris 1 M pH 7,5) durante 2 horas, a temperatura ambiente y en agitación, para ocupar los lugares libres de proteína y evitar el marcaje inespecífico.

A continuación, se incubó la membrana con el anticuerpo primario (endoglina, ab169545, *abcam*), diluido en solución de bloqueo, durante toda la noche a 4°C en agitación. Las condiciones a las que se emplearon los anticuerpos se encuentran en Tabla 7. Tras la incubación con el anticuerpo primario, se hicieron 3 lavados de 7 minutos con tampón de lavado y se incubó la membrana con el correspondiente anticuerpo secundario (una inmunoglobulina, IgG Rabbit, *StarBrightBlue 700*,

1:5000, Biorad), diluido en solución de bloqueo, durante dos horas, a temperatura ambiente, en agitación. Se hicieron 3 lavados de 7 minutos tras la incubación con el anticuerpo secundario.

Para el revelado se colocan las membranas en la bandeja del sistema ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad) y se exponen automáticamente mediante la selección de la longitud de onda del anticuerpo secundario utilizado, en este caso el anticuerpo *StarBrightBlue 700*, cuya excitación máxima es de 470 nm y emisión máxima de 700 nm.

## 5. Histología

Los tejidos destinados a la realización de los estudios histológicos se fijaron con formaldehído al 4% durante, al menos 24 horas. Después, se deshidrataron en etanol de concentración creciente desde 50% hasta absoluto y posteriormente en xileno. Tras la deshidratación, se incluyeron en parafina en una estufa a 60°C y se obtuvieron bloques, que se cortaron con un microtomo en secciones transversales de 3 µm de grosor. Por último, los cortes se depositaron en un portaobjetos y se dejaron secar en la estufa de 37°C, durante toda la noche para la técnica de inmunohistoquímica y en la estufa de 55° durante una hora para la tinción de rutina y tinciones histoquímicas.

### 5.1. Tinción Hematoxilina-Eosina (HE)

Esta técnica permite visualizar la estructura morfológica de las células individualizadas al microscopio óptico, su posición relativa y la forma de los núcleos dentro de las mismas.

Para llevar a cabo esta técnica de tinción, los cortes se desparafinan en xileno y se hidratan en concentraciones decrecientes de alcohol (absoluto, 95% y 70%) hasta llegar a agua destilada. A continuación, se sumergen en la solución de hematoxilina con mordiente de aluminio (Hematoxilina de Harris) durante 10 minutos. Este colorante posee afinidad con las estructuras de carácter ácido,

como los núcleos celulares tiñéndoles de azul/púrpura. Tras esta tinción, se lavan los restos de colorante con agua y se sumergen en alcohol clorhídrico, un diferenciador de la hematoxilina, con el cual este colorante apenas se une a estructuras afines. Se sumerge en eosina durante 30 segundos. La eosina tiene la capacidad de teñir las estructuras citoplasmáticas y componentes extracelulares con carácter básico en tonalidades de rosa a rojo. Por último, se deshidratan los cortes sumergiéndolos nuevamente en soluciones de etanol de concentración creciente (80%, 95% y absoluto) y xilol. Finalmente, se añade el medio de montaje DPX (resina acrílica con base de xileno) y se coloca un cubreobjetos para proteger los cortes. Las preparaciones se visualizaron en un microscopio óptico y se tomaron fotografías representativas.

## 5.2. Tinción Weigert-Van Gieson (WVG)

Para llevar a cabo esta tinción, se procedió a la hidratación de los cortes de manera similar a la tinción anterior.

El método se basa en la afinidad por las fibras elásticas del colorante que se obtiene haciendo reaccionar la fucsina básica y la resorcina en presencia de percloruro de hierro. Para ello se preparan los cortes con ácido peryódico al 1% y en seguida se tiñen las células sanguíneas de amarillo y los núcleos celulares de negro mediante la hematoxilina férrica de Weigert. Seguidamente, se contrasta con la Picrofucsina de Van Gieson, que permitirá ver las estructuras citoplasmáticas de un rosa/rojo suave y el resto de las fibras de la matriz (principalmente el colágeno) de un fucsia/rojo intenso. Finalmente, se diferencia con etanol absoluto durante dos minutos, se deshidrata y se montan los portas con los cubre mediante DPX.

## 5.3. Tricrómico de Masson (TM)

Este método asocia una coloración nuclear obtenida con la hematoxilina férrica de Weigert, tiñendo los núcleos de negro, seguida de una coloración de los hematíes con ácido pícrico de amarillo, una coloración del citoplasma, queratina,

fibras musculares y gránulos acidófilos de rojo con los colorantes ácidos (fucsina ácida-ponceau de xilidina), y después de la aplicación de la solución de ácido fosfomolibdico (mordant) una coloración selectiva de colágeno obtenida con el colorante verde luz.

#### 5.4. Inmunohistoquímica (IHQ)

Al igual que en los apartados anteriores, en primer lugar, se procedió al desparafinado de las muestras. Posteriormente, realizamos el desenmascaramiento antigénico mediante calor en buffer Tris (Tris Base 50 mM, EDTA 1 mM, pH 9,0) o buffer Citrato (Sodium Citrate Buffer 10 mM, 0.05% Tween™ 20, pH 6,0) durante 15 minutos. La fijación con formaldehído altera la estructura tridimensional de las proteínas, lo que puede provocar que los antígenos reconocidos por los anticuerpos pierdan la reactividad inmunológica. Las técnicas de desenmascaramiento revierten estos procesos, restaurando la conformación de los epítomos y eliminando los enlaces cruzados y los iones calcio. Una vez restaurados los epítomos, las muestras se trataron con peróxido de hidrógeno para inhibir la peroxidasa endógena y se incubaron en solución de bloqueo (Bovine Serum Albumin (BSA) al 3%/5%, Tween®20 al 5% en PBS) para evitar las uniones inespecíficas durante 1 hora en condiciones húmedas a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, las muestras se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente en BSA al 3% o al 5%, respectivamente, overnight a 4°C en condiciones de humedad.

Después, las muestras se aclararon con 3 lavados con PBS durante 7 minutos y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa de rábano picante (HRP, del inglés *Horseradish peroxidase*) correspondiente en BSA al 3% o al 5% durante 1-2 horas a temperatura ambiente, antes de volver a lavar con PBS. A continuación, se incubó durante 5 minutos con el cromógeno Diaminobencidina (DAB), un derivado de la bencidina que es oxidada por la peroxidasa proporcionando un color marrón.

Tras el análisis inmunohistoquímico, se realizó un contraste con Hematoxilina de Mayers durante 1 minuto, lo que confiere una tonalidad azul a morada al tejido. Por último, deshidratamos y montamos con el cubre mediante medio de montaje DPX.

## 6. Análisis de imagen

### 6.1. Análisis de las malformaciones arteriovenosas

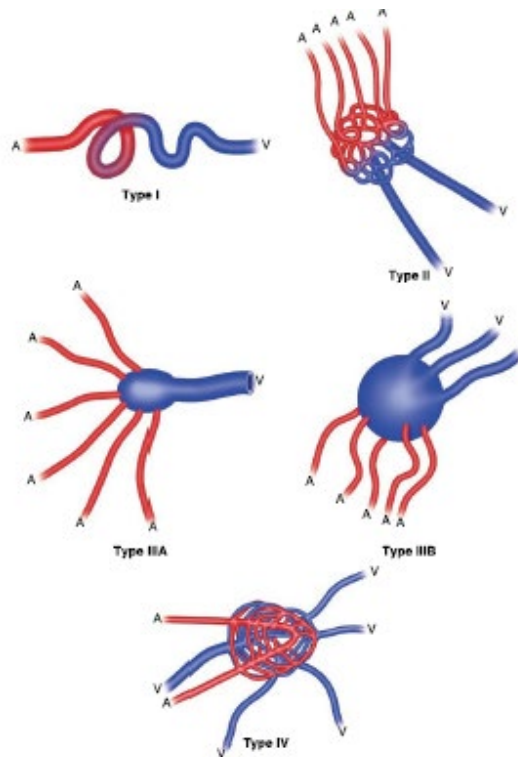
Tras el procesamiento de los tejidos perfundidos con látex, estos se fotografiaron bajo una lupa estereoscópica Leica M205.

El programa LAS v3.8 de Leica de la lupa permite hacer una combinación de las fotos tomadas originando la foto completa del tejido de la espalda del ratón. A todas las fotos realizadas se aplicó una plantilla de recorte generada en el *Adobe Photoshop*, para que todas las fotos tuviesen el mismo tamaño y número de píxeles y fueran representativas de las heridas cutáneas.

### Gravedad y tortuosidad de las MAV

En primer lugar, se evaluó la aparición de malformaciones arteriovenosas en las muestras de los grupos en estudio y se caracterizaron los grados de MAV y de tortuosidad de los vasos de forma subjetiva. Para ello empleamos la clasificación clínica de los grados de las malformaciones arteriovenosas de Yakes. En la clasificación de Yakes (Neto CASF and Durans M., 2019), las malformaciones arteriovenosas de tipo I consisten en fístulas directas de arteria a vena, las MAV de tipo II poseen múltiples arteriolas de entrada que derivan hacia una vena aneurismática que tiene una única salida, mientras que las MAV de tipo III se dividen en IIIa, cuando poseen múltiples arteriolas de entrada que drenan en múltiples venas con finas derivaciones en el medio y IIIb, cuando múltiples arteriolas de entrada drenan en múltiples venas con derivaciones dilatadas en el medio (Figura 14).

Por otro lado, la tortuosidad de los vasos fue clasificada atribuyendo grados del 1 al 3, en los cuales el 0 se corresponde con la ausencia de tortuosidad, el 1 con vasos poco tortuosos, el 2 con vasos con alguna tortuosidad y el 3 con vasos muy tortuosos.

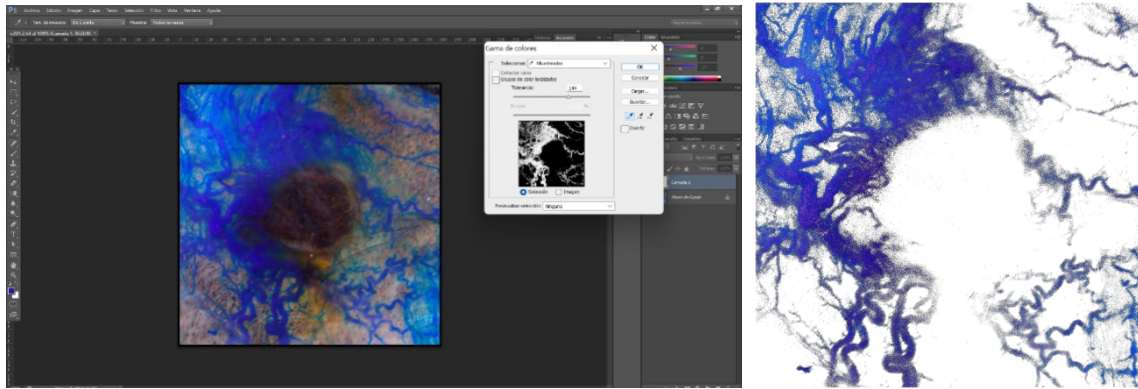


**Figura 9:** Representación esquemática de los grados de MAV según la clasificación clínica de Yakes.

## Cuantificación del área vascular

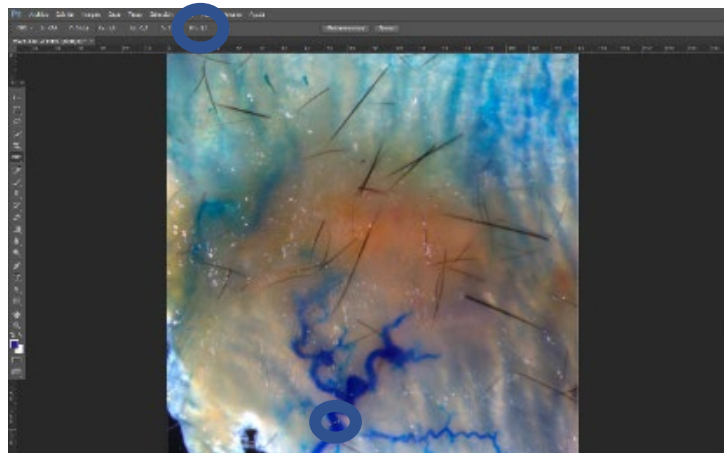
### Medida del calibre de los vasos

Para estudiar el área vascular, es decir, el área ocupada por los vasos perfundidos con látex, se midieron los píxeles azules usando para ello la herramienta de varita del *Adobe Photoshop* que permite seleccionar los píxeles con la misma tonalidad de color. De esta manera, se obtiene una imagen de los píxeles seleccionados que se corresponde con el árbol vascular (Figura 15).



**Figura 10:** Representación esquemática de la selección de los píxeles de tonalidad azul que se corresponden con los vasos perfundidos con látex, usando para ello la herramienta de la varita mágica del *Adobe Photoshop*.

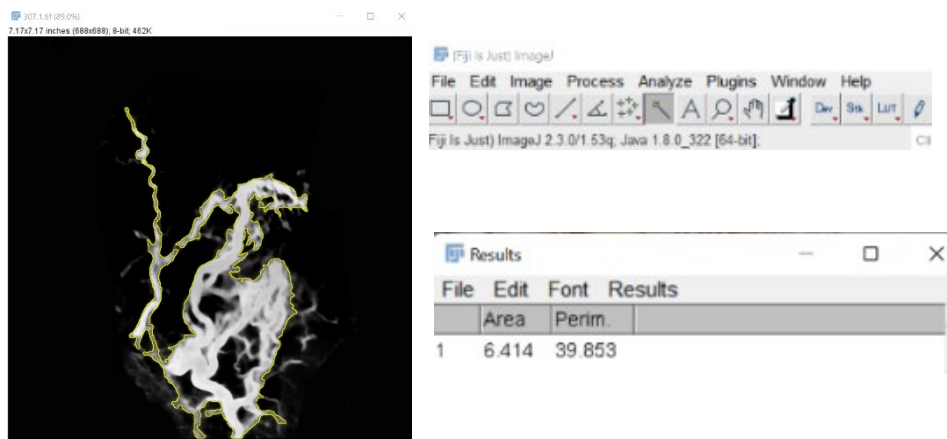
Para estudiar el calibre de los vasos, se usó la herramienta regla del *Adobe Photoshop*, donde se cogieron cinco medidas aleatorias de cada herida, representativas del diámetro de los vasos (Figura 16).



**Figura 11:** Representación esquemática de la medición del diámetro de los vasos perfundidos con látex usando la herramienta de la regla del *Adobe Photoshop*.

Posteriormente, se estudiaron los ratio perímetro/área de la vasculatura de las heridas cutáneas usando el software *Fiji*, mediante la selección de los vasos que pretendíamos analizar (Figura 17).

## Ratio perímetro/área

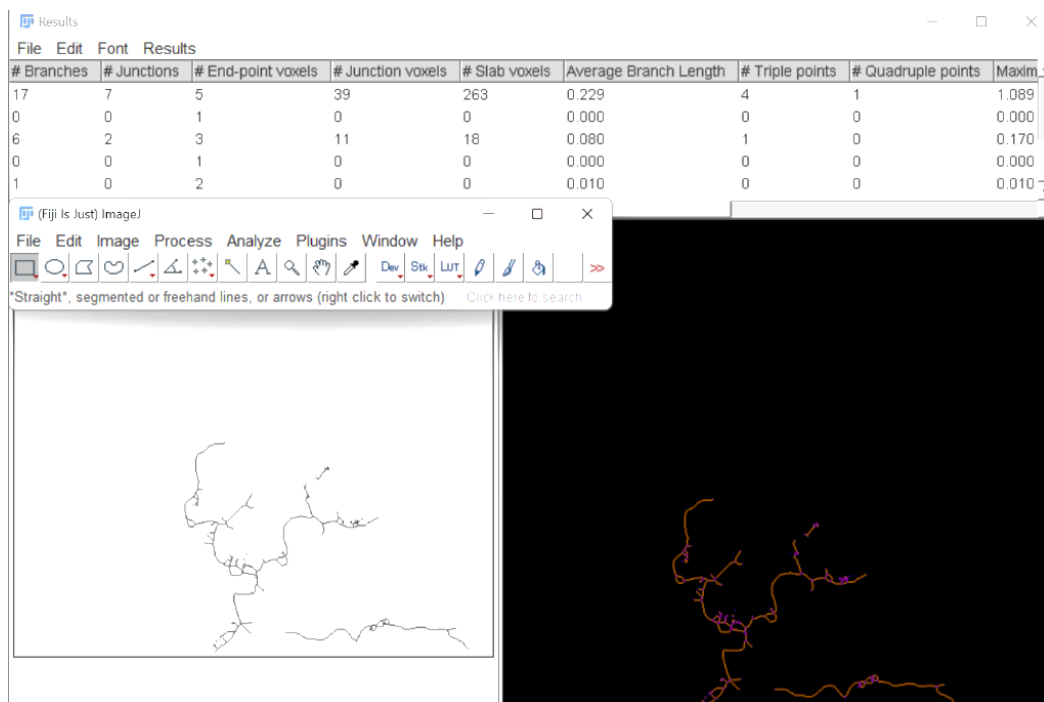


**Figura 12:** Representación esquemática de la cuantificación de los parámetros área y perímetro de la vasculatura de las heridas cutáneas usando el software *Fiji*.

## Análisis del esqueleto de la vasculatura

Para llevar a cabo la cuantificación de la complejidad de los vasos perfundidos con látex de los tres grupos experimentales, se utilizó el software *Fiji* que dispone de una herramienta denominada “*Skeleton*”. Antes de utilizar este programa, se abrieron las fotografías en el software *Adobe Photoshop CC* y tras la obtención de la selección de píxeles azules, se añadió una capa. Sobre esta capa se utilizó el pincel para repasar la estructura creada y después fue copiada en *Fiji* donde el patrón fue convertido en un esqueleto de ramificaciones y puntos de unión gracias a la herramienta “*Skeletonize (2D/3D)*”. La herramienta “*Skeletonize (2D/3D)*” de *Fiji* convierte el árbol vascular en un esqueleto digital. Sobre este esqueleto digitalizado de las estructuras tridimensionales, la herramienta

“Analyze Skeleton (2D/3D)” del software dibuja y recuenta varios parámetros de los cuales utilizaremos los siguientes: número de ramas, longitud media de las ramas y número de puntos triples (Figura 18).



**Figura 13:** Representación esquemática de la herramienta “Skeletonize (2D/3D)” de Fiji. Tras la obtención del esqueleto digital del árbol vascular, el programa permite analizar varios parámetros de estas estructuras generando una imagen del esqueleto en colores, donde se distinguen ramificaciones y puntos de unión. La herramienta ofrece el análisis de múltiples parámetros que describen la complejidad de los vasos analizados.

## 6.2. Análisis histológico

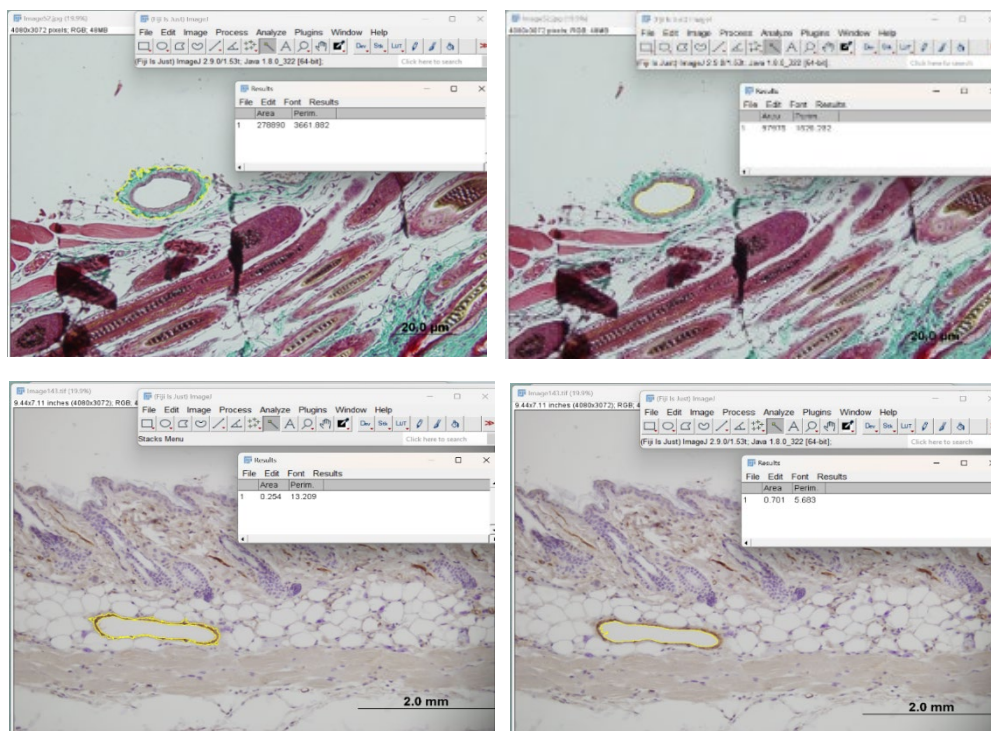
### 6.2.1. Análisis de la estructura de los vasos

Para cuantificar la constitución de la pared de los vasos grandes teñimos la capa muscular de los vasos mediante la tinción inmunohistoquímica de  $\alpha$ -SMA y la capa fibrótica mediante la tinción de Tricrómico de Masson.

Se tomaron fotos de todos los vasos grandes de las muestras de todos los grupos a 20 aumentos. Para ello se utilizó una cámara de alta resolución acoplada a un microscopio óptico Olympus BX51.

Tras obtener estas fotos, se procesaron utilizando el software *Fiji (Image J)*, el cual permite obtener la medición de los varios parámetros como los perímetros y áreas de interés de la capa de los vasos y su lumen.

Tras ello, se calcularon los ratios del área de la capa muscular/fibrótica con respecto al perímetro de lumen de vaso, obteniendo así el grosor de las capas y se compararon los grupos en estudio (Figura 19).

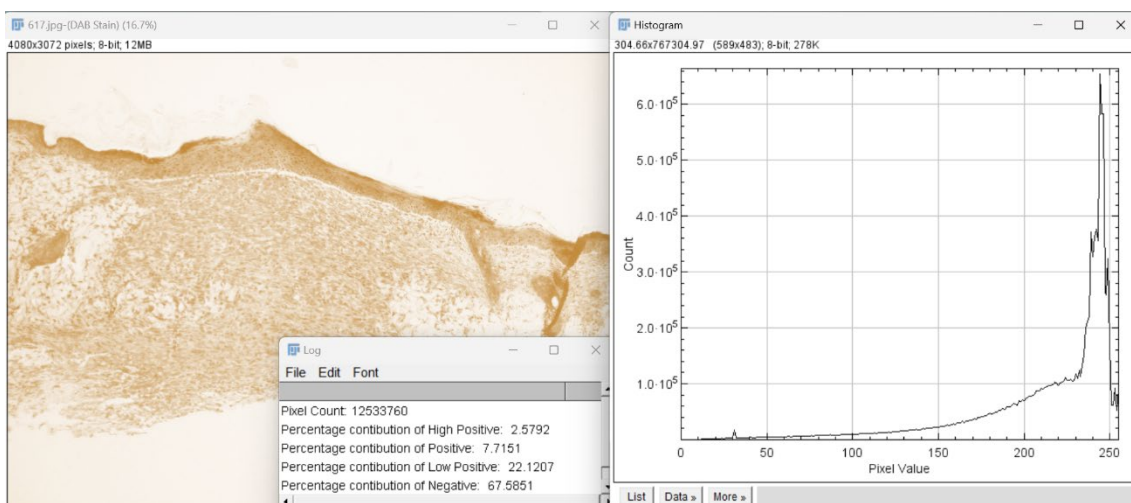


**Figura 14:** Representación esquemática de la cuantificación de los parámetros área y perímetro de los vasos en las fotos de las tinciones Tricrómico de Masson e inmunohistoquímica de  $\alpha$ -SMA usando el software Fiji.

### 6.2.2. Análisis del microambiente inmune

Para cuantificar la expresión de los marcadores inmunes TNF- $\alpha$  y HGF, se tomaron fotos de la zona del epitelio de cicatrización de la herida generada a 10 aumentos y las fotos fueron procesadas utilizando el software *Fiji (Image J)*. Tras abrir la foto con el programa, se utilizó el complemento “*IHC Profiler*” seleccionando el

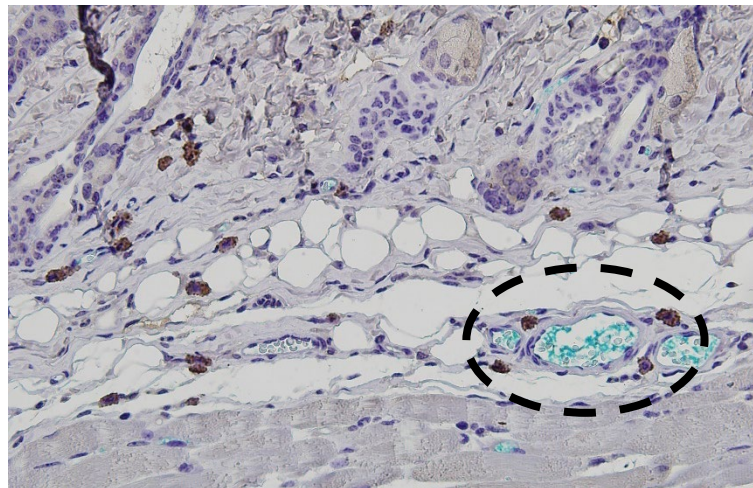
modelo “H-DAB”. El propio programa genera una imagen en la que se ve solamente las zonas teñidas por estos marcadores. El programa automáticamente da unos valores en porcentaje de *High Positive*, *Positive* y *Low Positive*, de los cuales, descartamos el valor de *Low Positive*, por poder corresponderse con fondo inespecífico, y valoramos solo los valores de *High Positive* y *Positive* cuya suma es la que usamos para la realización de las gráficas y la obtención de los resultados (Figura 20).



**Figura 15:** Cuantificación de la expresión de los marcadores inmunes HGF y TNF- $\alpha$  usando el plugin *IHC Profiler* seleccionando el modelo “H-DAB” del software *Fiji*.

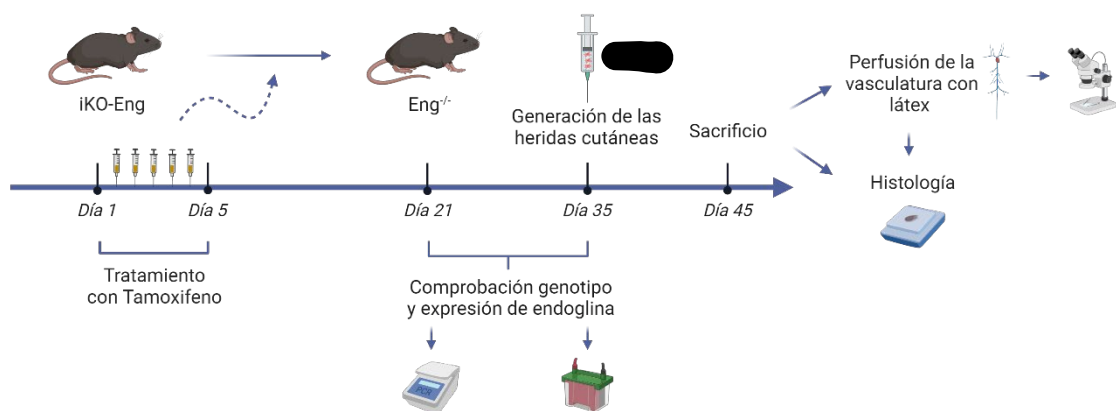
Con respecto a los macrófagos, marcados con el anticuerpo F4/80 y con el anticuerpo CD206, que tiñen los macrófagos totales y los macrófagos de perfil M2, respectivamente, se procedió a un conteo manual, observando al microscopio óptico las muestras.

En el caso del anticuerpo F4/80, procedimos al conteo de los macrófagos totales de la muestra y los macrófagos perivasculares, es decir los macrófagos que se encuentran alrededor de los vasos a una distancia máxima de tres núcleos. Y en el caso del anticuerpo CD206, nos limitamos a contabilizar los macrófagos perivasculares (Figura 21).



**Figura 16:** Microfotografía de la tinción de inmunohistoquímica de F4/80 que tiñe los macrófagos totales donde se enmarca la zona considerada perivascular.

## 7. Diseño experimental



**Figura 17:** Representación esquemática del diseño experimental llevado a cabo. Se indican los procedimientos realizados en cada momento hasta el sacrificio de los ratones y posterior recogida de muestras.

Para llevar a cabo los experimentos descritos en este trabajo se siguió el siguiente diseño experimental. En primer lugar, se administró tamoxifeno durante cinco

días consecutivos de manera intraperitoneal a todos los ratones del estudio para provocar la recombinación de la secuencia del gen de endoglina flanqueada por secuencias *Loxp* y provocar la delección de los exones 5 y 6. A los 35 días, se generaron las heridas cutáneas, en las cuales en un grupo de ratones [REDACTED]. Diez días después se procedió a recoger tejido cutáneo para histología o a la perfusión de la vasculatura con látex azul. Tras la perfusión con látex se procesaron los tejidos para fotografiar en la lupa o para estudio histológico (Figura 22).

La elección de los 35 días post-administración del tamoxifeno se debe a que en un experimento previo se comprobó el genotipo del ratón mediante PCR a los 21 días y, a continuación, la expresión de la proteína endoglina a los 35 días en los ratones *knockout* inducibles que poseen la recombinasa *cre*; y en ese tiempo la expresión de endoglina era indetectable.

## 8. Tratamiento de datos y análisis estadístico

Los datos fueron obtenidos según lo descrito anteriormente en cada uno de los apartados de procedimientos experimentales. En todos los experimentos *in vivo*, se recogieron datos de, al menos, 12 ratones por grupo.

La preparación de los datos para su análisis estadístico fue rigurosa. Se realizó una descriptiva de los datos y de acuerdo con sus características se organizaron en bases de datos que recogen todas las variables correspondientes a cada individuo. Dichas bases de datos se diseñaron con el programa informático *Microsoft Excel Office 365*.

Para el análisis estadístico, se empleó el software Prism 9 de *Graphpad*. Se estudió, en primer lugar, si la variable o variables a estudiar se distribuían de forma normal, es decir, si la distribución de los datos se ajusta a la campana de *Gauss* o, por el contrario, seguían una distribución no paramétrica. Para comparar dos variables se ha aplicado el test estadístico t de Student, en los casos en los que se sigue una distribución normal, y el test U de Mann Whitney, para los casos en los que no se ajustan a la campana de *Gauss*.

Para determinar las diferencias significativas entre más de dos grupos de datos, se utilizó el test estadístico de análisis de la varianza (ANOVA) de una vía para los casos en los que se sigue una distribución normal y el test de Kruskal-Wallis, para los casos en los que no se ajustan a la campana de Gauss.

En el caso del análisis de tablas de contingencia para resumir la relación entre las variables categóricas se aplicó el test de Chi cuadrado.

En todos los casos se consideró significativo un valor de  $p < 0,05$  y altamente significativo un valor de  $p < 0,01$ .

## Información de anticuerpos, reactivos, soluciones, material, equipo y software

### Material

**Tabla 4: Material utilizado**

Materiales	Nombre original	Casa comercial	Referencia
Tubos de polipropileno PE50	Masterflex™ Tubos de microcalibre Tygon™	Cole-Parmer	AAD02103-CD
Llaves de 3 vías y adaptadores Luer	Luer Assortment Kit	Cole-Parmer	800.323.4340
Mini PAP Pen	Mini PAP Pen	Sigma	
Agujas 23G	Aguja STERICAN 23 G	Braun	4657667
Agujas 27G	Aguja STERICAN 27 G	Braun	300635
Hoja de Bisturí	Hojas bisturí	Krape	BS EN 27740

Portaobjetos de Inmunohistoquímica	Portaobjetos de adhesión, SuperFrost® Plus Adhesion Microscope Slides, Epedria	Thermo Fisher Scientific	J1800 AMNZ
Portaobjetos de Histología	Portaobjetos	Casa Álvarez	7626EBB90
Cubreobjetos	Cubreobjetos 24x40	Casa Álvarez	K2440
Cuchillas de Microtomo	Cuchillas desechables A35	Casa Álvarez	07500011
Filtro embudo 70 µm	Strainer 70 µm	Corning	352350
Jeringas 1 mL	Jeringas estériles de un solo uso 1ml	Thermo Fisher Scientific	15889142
Jeringas 10 mL	Jeringas estériles de un solo uso 10 ml	Thermo Fisher Scientific	14955459
Jeringas 20 mL	Jeringas estériles de un solo uso 20 ml	Thermo Fisher Scientific	14955454
Casete se inclusión de histología	Casetes de rejilla con tapa Tespa	Casa Álvarez	-
Punch de biopsia 5 mm	Disponible biopsy punch	Kai medical	BP-307

## Reactivos y productos

**Tabla 5:** Reactivos y productos utilizados en este trabajo

Reactivo/producto	Nombre original	Casa comercial	Referencia
Tamoxifeno	Tamoxifen	Sigma	T5648
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno al 30%	Thermo Fisher Scientific	BP2633
DAB	Diaminobenzidina	Abcam	Ab64238
BSA	Bovine serum albumin	Sigma-Aldrich	A9418
Hematoxilina de Mayer	Hematoxilina de Mayer modificada	Thermo Fisher Scientific	10016828
Hematoxilina de Harris	Hematoxilina Harris	Casa Álvarez	102331
Eosina alcohólica	Eosina 1% solución alcohólica	Casa Álvarez	103051
Kit Weigert Van Gieson	Kit Weigert Van Gieson	Casa Álvarez	WVG1026
Kit Tricrómico de Masson	Kit Tricrómico de Masson	Casa Álvarez	TM1033
Isoflurano	Vetflursane	Virbac	57837-4
Nitroprusiato	<i>Nitroprussiate</i>	Rottapharm	-
Heparina	Heparina 1% (5 000 UI)	Hospira	654754.0
DMEM	DMEM	Thermo Fisher Scientific	41966
Penicilina-Estreptomicina	Penicilina-estreptomicina (10.000 U/ml)	Gibco	11548876
Colagenasa tipo I	<i>Clostridium Histolyticum</i>	Sigma-Aldrich	C7926
Proteinasa K	<i>Proteinase K</i>	Roche	03115879001
APS	Persulfato amónico	Sigma-Aldrich	A3678

Acrilamida	30% acrylamide and bis-acrylamide solution, 29:1	Biorad	1610156
TEMED	TEMED	Sigma-Aldrich	8.04782
$\beta$ -mercaptoethanol	$\beta$ -mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	M6250
Trichloroethanol	2,2,2-Trichloroethanol	Sigma-Aldrich	T54801
Agarosa	Agarosa	Lonza	50000
10x Standard reaction buffer with MgCl <sub>2</sub>	10x Standard reaction buffer with MgCl <sub>2</sub>	Biotools	20.034-4182
Isopropanol	Álcool Isopropílico	Casa Álvarez	ISO90101.1221
Etanol 99%	Etanol Desnaturalizado – Histodry	Casa Álvarez	HI4401021221
Sustituto Xileno	Clear Hist 775	Casa Álvarez	AF21HIS775
Medio de Montaje	Medio de montaje DPX	Casa Álvarez	108500
Formaldehído 3,5-4% tamponado	Formalina al 4%	Casa Álvarez	FO090101.1221
Metanol	Methanol	Sigma-Aldrich	322415
Tween 20	TWEEN™20	Sigma-Aldrich	P1379
Matrigel™	Matrigel™	Corning	356237
Marcador de pesos moleculares PageRuler™	Marcador de pesos moleculares PageRuler™	Thermo Fisher Scientific	26616
Marcador 1 Kb (1Kb Plus DNA Ladder)	Marcador 1 Kb (1Kb Plus DNA Ladder)	Thermo Fisher Scientific	10787-018

Inhibidores de fosfatasas PhosSTOP	Inhibidores de fosfatasas PhosSTOP	Roche	04 906 837
Inhibidores de proteasas Complete	Inhibidores de proteasas Complete	Roche	11 697 498
Látex	Latex Injection Medium Blue	Holden's	-

## Soluciones

**Tabla 6: Soluciones utilizadas**

Soluciones	Composición
PBS	NaCl 138 mM; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 8,1 mM; KCl 3 mM; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,5 mM; H <sub>2</sub> O miliQ csp. pH = 7,4
Suero salino heparinizado	NaCl 0,9%. pH = 7,4; 100 mL de NaCl, con 500 µL de Heparina
Tampón de lisis para PCR	Tris 50 mM; EDTA 5 mM; NaCl 100 mM; DTT 1 mM; espermidina 0,5 mM; proteinasa K 250 ng/µL
Tampón de lisis para Western Blot	Tris-HCL 1 M pH 7,5 20 mM; NaCl 3 M 140 mM; EDTA 0,5 M pH 8,0 10 mM; Glicerol 10%; Igepal CA-630 1%; 100 mL H <sub>2</sub> O mQ
TBE 10x	Tris 60,57 g, ácido bórico 30,92 g, EDTA 3,722 g. Llevar a 900 ml de agua miliQ. Ajustar pH a 8,1-8,3. Enrasar a 1L
TBS	137 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl; H <sub>2</sub> O miliQ csp. pH = 7,3

Tampón Citrato Sódico pH 6,0	Sodium Citrate Buffer 10 mM, 0,05% Tween 20, pH 6,0
Tampón EDTA pH 9,0	10mM Tris Base, 1mM EDTA Solution, 0,05% Tween 20, pH 9,0
Peróxido de Hidrógeno al 3%	5 mL de peróxido de Hidrógeno al 30% en 45 mL de agua destilada
BSA 3%	3 gramos de BSA; 100 mL de PBS

## Anticuerpos

**Tabla 7: Anticuerpos utilizados en este trabajo**

Anticuerpo	Referencia	Casa Comercial	Concentración
CD105	ab169545	Abcam	1:1000
Anticuerpo secundario Goat anti-Rabbit StarBright Blue 700	12004162	Biorad	1:100000
CD105	Ab170943	Abcam	1:100
$\alpha$ SMA	ab5694	Abcam	1:500
F4/80	ab6640	Abcam	1:100
CD206	ab64693	Abcam	1:7500
TNF- $\alpha$	ab6671	Abcam	1:50
HGF	PA5-115354	Invitrogen	1:100
Anticuerpo secundario Goat anti-Rabbit HRP	1706515	Biorad	1:200

Anticuerpo secundario Goat anti-mouse HRP	170-6516	Biorad	1:200
Anticuerpo secundario Donkey anti-Rat HRP	SAB3700596	Sigma	1:200

## Equipo y Software

**Tabla 8: Equipo utilizado en este trabajo**

Equipo/Aparato	Casa Comercial	Modelo
Campana de flujo laminar vertical	Flow Laboratories	Gelaire TC-48
Espectrofotómetro	BioTek	BioTek Epoch
Bombas de perfusión	WPI	ALADDIN-1000
Máquina de anestesia inhalatoria	-	MSS Isoflurane
Máquina de rasurar	Oster	Golden A5
pHmetro	Crison	Basic 20
Termociclador	Bio-Rad	MyCycler™
Transiluminador	Bio-Rad	GelDoc
Microscopio estereoscópico equipado con cámara fotográfica	Leica	Microscopio M205 FA y cámara DFC 495
Chemidoc MP	Biorad	Chemidoc MP Imaging Systems
Equipo de electroforesis de PCR	Biorad	Wide Mini-Sub Cell GT Horizontal

Imán para tubos de 15 mL	Thermo Fisher Scientific	Dynamag™-15
Microscopio óptico	BX51	Olympus 31
Centrífuga	Hermle	Z 233 M-2

**Tabla 9: Software utilizado**

Programa informático	Compañía
Adobe Photoshop CS3	Adobe Systems Incorporated
Gen5	BioTek
GraphPad Prism 9	GraphPad Software, Inc.
iQTM5 Optical System Software	Bio-Rad
Quantity One	Bio-Rad
Image J ( <i>Fiji</i> )	National Institutes of Health
LAS (Leica Application Suite) software v3.8	Leica Microsystems, Alemania





# Resultados



## 1. Puesta a punto de un modelo de MAV dependiente de la expresión de endoglina

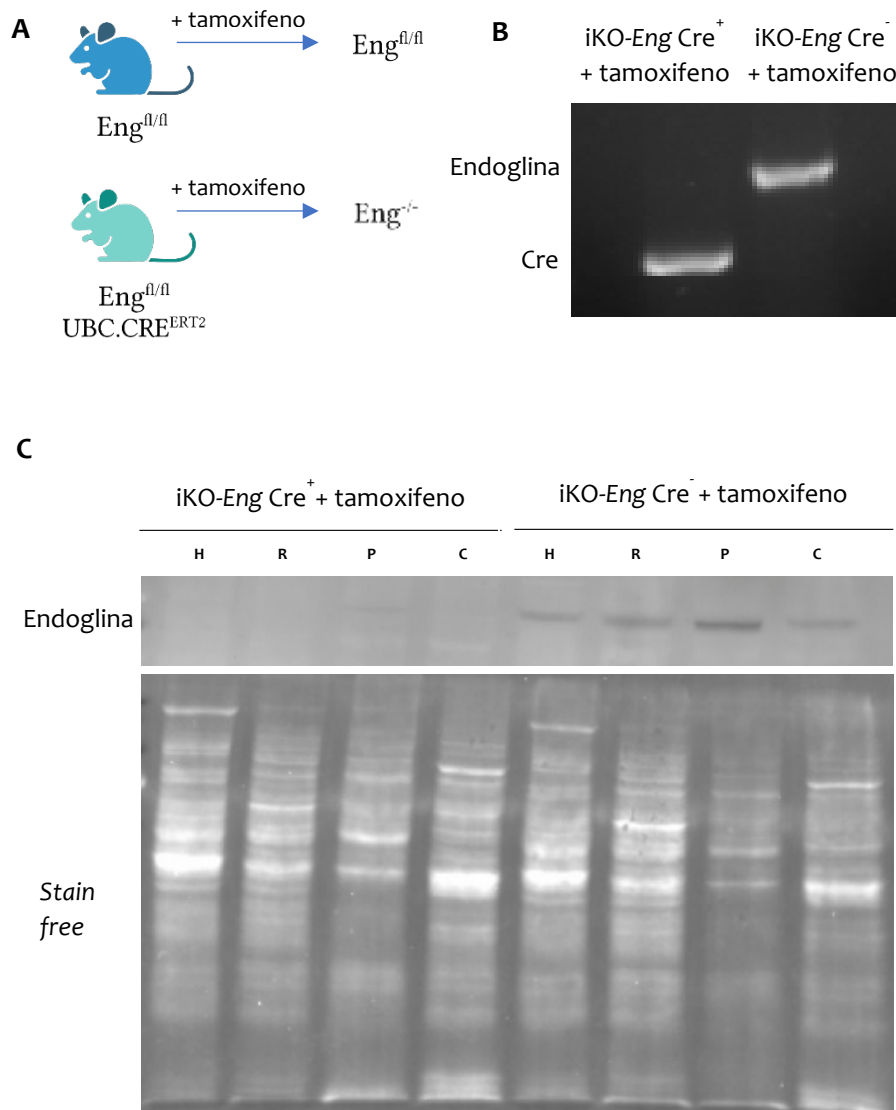
Para estudiar la aparición y desarrollo de las malformaciones arteriovenosas, así como una aproximación terapéutica a estas lesiones, en primer lugar, nos centramos en obtener y comprobar el modelo murino de este proceso.

Algunos autores comprobaron previamente que en los ratones heterocigotos para endoglina (o *ALK1*), que son el modelo genético de la HHT, las MAV aparecían infrecuentemente y dependiendo del fondo genético. Esas malformaciones sólo aparecían en modelos *knockout* que, además, estaban llevando a cabo un proceso angiogénico o inflamatorio. Por ello nos propusimos comprobar si se formaban MAV en ratones *Eng<sup>-/-</sup>* que estuvieran llevando a cabo un proceso de cicatrización de heridas cutáneas. Como la deficiencia de endoglina es letal durante el desarrollo embrionario, empleamos un modelo de ratón KO inducible por tamoxifeno.

Para obtener ratones *Eng<sup>-/-</sup>* a partir del ratón *Eng-floxed*, se indujo la actividad de la Cre recombinasa mediante la administración intraperitoneal de tamoxifeno durante 5 días consecutivos (Figura 23A). Para asegurarnos de que el tamoxifeno había hecho efecto y los ratones eran completamente *Eng<sup>-/-</sup>*, realizamos PCR convencional con DNA genómico extraído de la porción final de la cola de los ratones *iKO-Eng Cre<sup>-</sup>* y *iKO-Eng Cre<sup>+</sup>*. Se observó que la pérdida completa del gen de endoglina ocurría tras 21 días de la primera inyección de tamoxifeno (Figura 23B), ya que en los días previos aún se observaba la presencia parcial del gen (datos no mostrados).

Sin embargo, aunque se haya perdido el gen de endoglina en el DNA genómico, aún podría quedar expresión residual de la proteína ya que depende de la vida media de la misma. Por ello, estudiamos mediante la técnica de Western Blot, cuándo se producía la pérdida completa de la proteína de endoglina mediante la técnica de Western Blot. Para ello, aislamos proteína de diferentes tejidos (hígado, riñón, pulmón y corazón) de los ratones *Eng-Cre<sup>+</sup>* y *Eng-Cre<sup>-</sup>* tratados con

tamoxifeno y comparamos la expresión de endogлина. Nuestros resultados muestran que ya no se detecta expresión de proteína a los 35 días tras la primera inyección con tamoxifeno (Figura 23C). Por esa razón, este fue el tiempo que determinamos para comenzar los ensayos de cicatrización de heridas.



**Figura 18: Expresión génica y proteica de endogлина tras la administración de tamoxifeno.** A) Representación esquemática del modelo murino tras la administración de tamoxifeno; B) Expresión génica de endogлина en las colas de ratones iKO-Eng Cre<sup>+</sup> y iKO-Eng Cre<sup>-</sup> analizada por PCR convencional; C) Niveles de la proteína endogлина en diferentes tejidos, concretamente, hígado (H), riñón (R), pulmón (P) y corazón (C) de los ratones iKO-Eng Cre<sup>+</sup> y iKO-Eng Cre<sup>-</sup>, analizados por Western Blot, utilizando la técnica de *stain free* como control de carga.

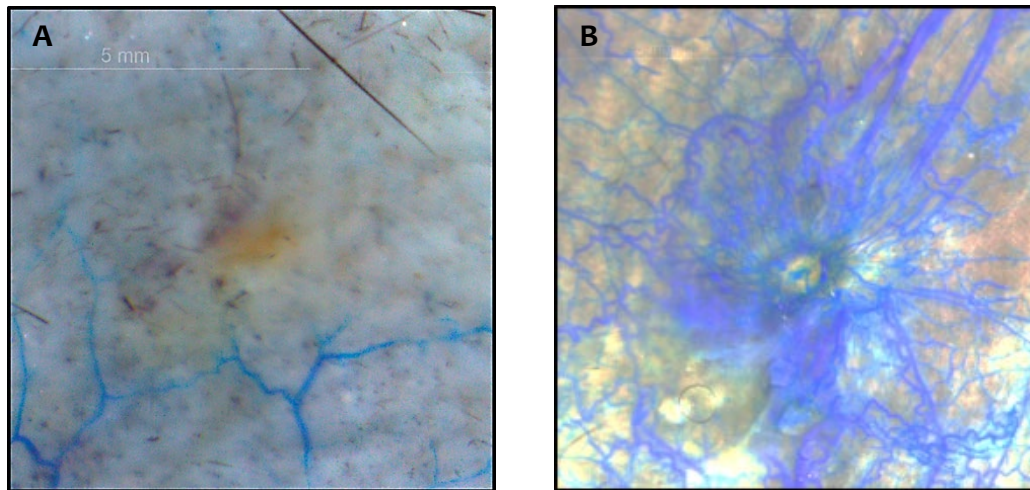
## 1.2. Análisis macroscópico bajo la lupa estereoscópica de los vasos perfundidos con látex en las heridas cutáneas

Para intentar desarrollar el modelo de MAV, realizamos heridas en la espalda de animales que habían perdido la expresión de endoglin, es decir, ratones  $iKO-Cre^+$  y analizamos la vasculatura formada durante ese proceso. Comparamos con ratones  $iKO-Cre^-$  como controles. Diez días después de la generación de las heridas, perfundimos los tejidos con un látex azul que nos permite analizar la vasculatura formada.

Los tejidos perfundidos con látex fueron analizados y fotografiados bajo una lupa estereoscópica, lo que nos permitió obtener una imagen completa de estas muestras.

Ya a simple vista, en las muestras controles de la herida de la espalda se observa que la vasculatura es organizada y se dispone en una monocapa y, al mismo tiempo, los vasos se caracterizan por ser finos y lineales (Figura 24A).

Sin embargo, en los ratones  $Eng^{-/-}$  la vasculatura es desorganizada y se observa superposición de vasos. Además, estos aparentan ser más dilatados, tortuosos y ramificados (Figura 24B). Como el látex apenas penetra en los capilares, los vasos teñidos de azul serán grandes vasos que irrigan o rodean la zona de la herida.



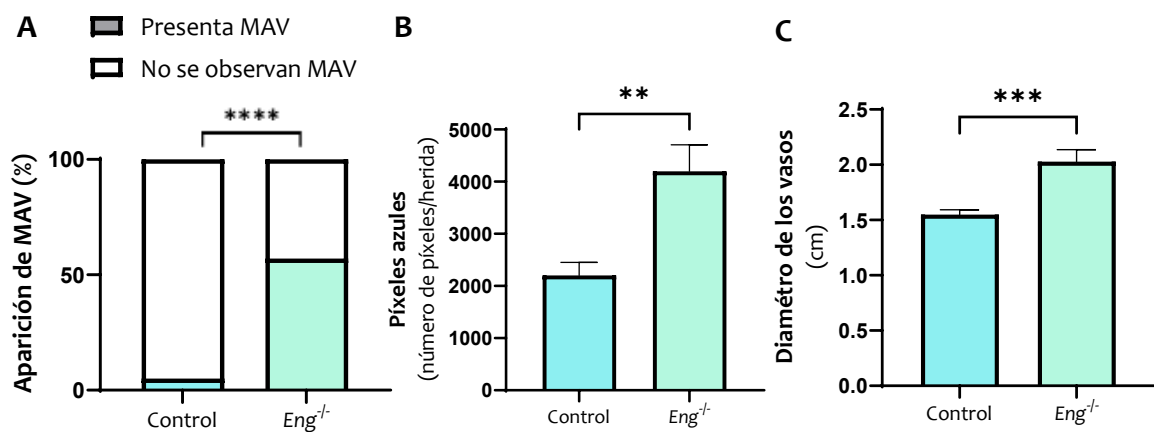
**Figura 19: Microfotografías de vasos perfundidos con látex de un ratón control (A) y un ratón  $Eng^{f/f}$  (B)** A) Microfotografía representativa de la vasculatura del entorno de la herida en un ratón control; B) Microfotografía representativa de la vasculatura del entorno de la herida en un ratón  $Eng^{f/f}$ .

Como una primera aproximación para cuantificar las diferencias observadas, evaluamos la presencia de malformaciones arteriovenosas, es decir, de una maraña de vasos más o menos tortuosos y generalmente con un diámetro aumentado alrededor de las heridas cutáneas previamente generadas. Eso nos permitió calcular la frecuencia de aparición de las malformaciones arteriovenosas en los dos grupos en estudio. Se observó que los ratones control casi no presentan MAV, es decir, apenas 5% de los ratones han generado malformaciones arteriovenosas, mientras que la mayoría de los ratones  $Eng^{f/f}$ , el 57% de los ratones, sí las generan (Figura 25A). Estas diferencias son estadísticamente significativas. Nuestro objetivo es obtener un modelo en el que podamos tomar medidas cuantitativas y no solo cualitativas, por lo que quisimos cuantificar las diferencias observadas con respecto a la estructura y organización de los vasos y para ello recurrimos a dos parámetros objetivos.

En primer lugar, gracias al color azul del látex utilizado, analizamos el área ocupada por los vasos estimándolo a partir del número de píxeles azules que rodean la zona de la herida. A todas las fotos realizadas se aplicó una plantilla de recorte generada en el *Adobe Photoshop*, para que todas las fotos tuviesen el

mismo tamaño y número de píxeles y fueran representativas de las heridas cutáneas.

El análisis demostró que el grupo de ratones *Eng<sup>-/-</sup>* presenta un área vascular significativamente superior al grupo de los ratones control (figura 25B). Por otro lado, estudiamos el calibre de los vasos tomando cinco medidas aleatorias del diámetro de los vasos de mayores dimensiones que rodean la herida. Se observó que los ratones *Eng<sup>-/-</sup>* presentan vasos de calibre significativamente superior con respecto al grupo control (Figura 25C).



**Figura 20: Cuantificación del área vascular ocupada por el látex y calibre de los vasos en los ratones control y *Eng<sup>-/-</sup>*.** A) Porcentaje de aparición de MAVs; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; test de contingencia; B) Cuantificación del número de píxeles azules \*\* $p < 0,01$ ; C) Cuantificación del diámetro de los vasos perfundidos con látex \*\*\* $p < 0,001$ . Cada barra representa la media  $\pm$  EEM, test estadístico U de Mann-Whitney (B y C). Heridas de los ratones control ( $n=39$ ) y heridas de los ratones *Eng<sup>-/-</sup>* ( $n=44$ ).

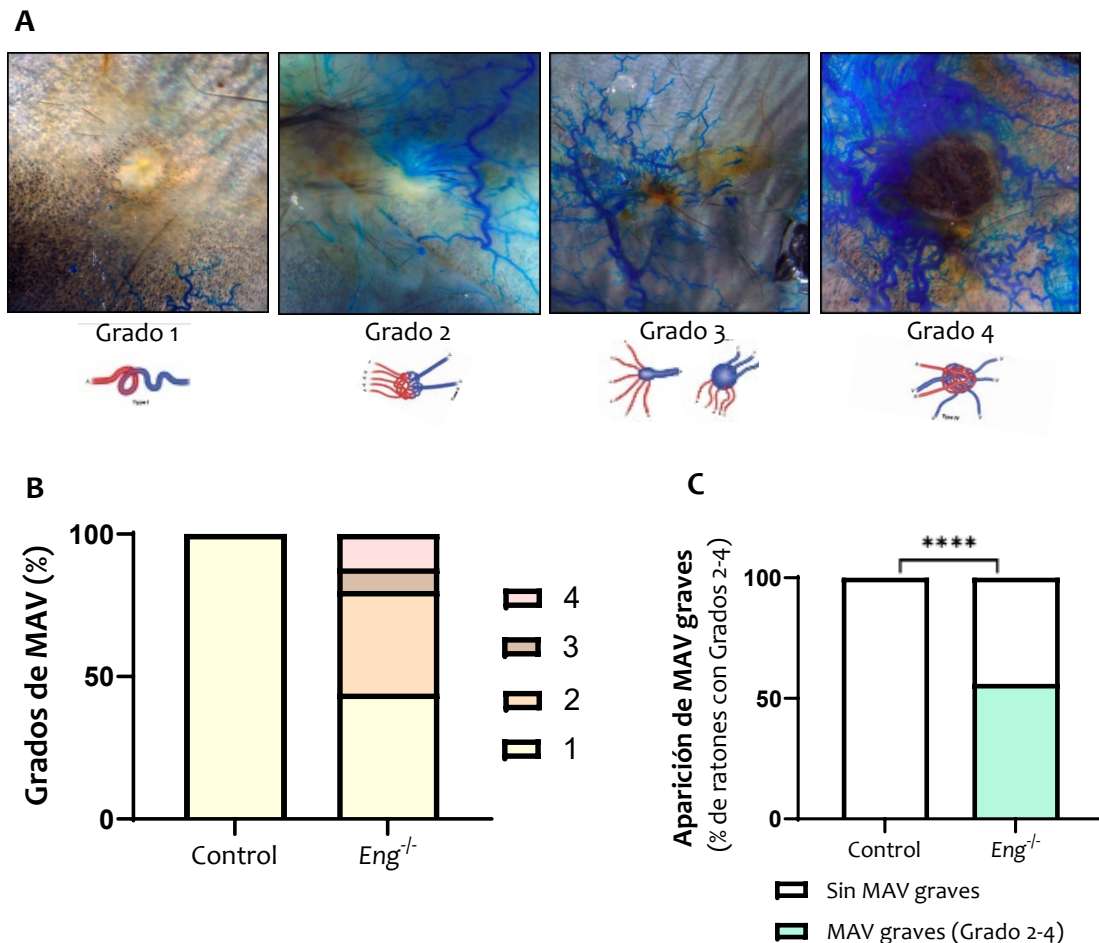
A continuación, nos planteamos establecer una gradación de las MAV observadas, ya que en la clínica es una manera de evaluar su grado de gravedad y predecir su comportamiento.

Para analizar los grados de MAV nos basamos en la clasificación clínica de Yakes (Neto CASF and Durans M., 2019), en la que el grado 1 se caracteriza por una fístula arteriovenosa directa, es decir, una conexión directa de arteria a vena. El grado 2

es una MAV caracterizada generalmente por múltiples arterias de entrada en un patrón de "nidus" con estructuras directas de arteriola a vena o un nido de malformaciones que luego drenan en una sola vena. El grado 3 son múltiples arterias-arteriolas que conectan en la pared de una vena agrandada. Y las MAV grado 4 son microfístulas de innumerables estructuras en forma de arteriolas que se desvían hacia innumerables conexiones venulares que infiltran difusamente un tejido (Figura 26A).

Tras esta valoración y según nuestro análisis subjetivo, observamos que el grupo control sólo posee algún vaso que podríamos identificar como MAV de grado 1, que se correspondería con el grado más leve, mientras que en los ratones *Eng<sup>-/-</sup>*, las malformaciones arteriovenosas presentan un grado que oscila entre el grado 1 y el grado 4 (Figura 26B).

Si consideramos exclusivamente las MAV graves, es decir MAV con grado superior al grado 1, para evitar posibles errores de clasificación de vasos normales como MAV, observamos que los ratones control no poseen MAV graves, mientras que 32% de los ratones *Eng<sup>-/-</sup>* presentan MAV de grado 2, 3 y 4. Examinando más detenidamente, estos ratones presentan 44% de MAV de grado 1, 36% de grado 2, 8% grado 3 y 12% grado 4, por lo que la mayoría de las MAVs generadas son MAVs con grado superior a 1 (Figura 26C). Según nuestro análisis estos resultados son estadísticamente significativos.

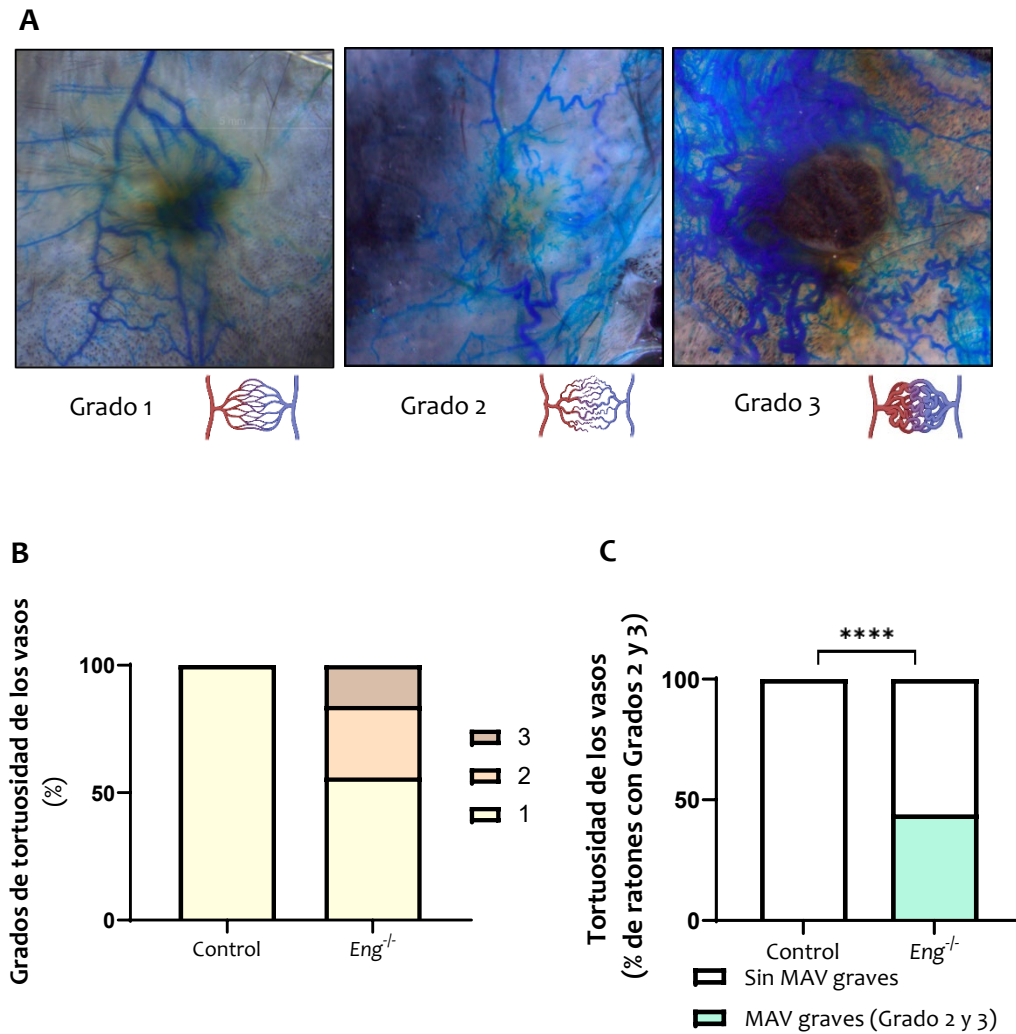


**Figura 21: Análisis de los grados de MAV y gravedad en los ratones control y Eng<sup>-/-</sup>.** A) Microfotografías representativas de los grados de MAV de los vasos perfundidos con látex; B) Cuantificación del porcentaje de los distintos grados de MAV en los ratones control y ratones Eng<sup>-/-</sup>; C) Cuantificación del porcentaje de gravedad de las MAV en los ratones control y Eng<sup>-/-</sup>, \*\*\*\*p < 0,0001; Test de contingencia, heridas de los ratones control (n=39) y heridas de los ratones Eng<sup>-/-</sup> (n=44).

Otro parámetro relevante en la caracterización de las malformaciones arteriovenosas es su grado de tortuosidad, es decir, el grado de curvas o giros que presentan los vasos sanguíneos en su recorrido.

La tortuosidad de los vasos fue clasificada atribuyendo grados del 1 al 3, en los cuales el grado 1 se corresponde con vasos poco tortuosos, el 2 con vasos con alguna tortuosidad y el 3 con vasos muy tortuosos (Figura 27A). Tras la atribución de estos valores, se observó que el grupo control presenta exclusivamente vasos con poca tortuosidad, es decir, todas son de grado 1 (Figura 27B), mientras que

los ratones  $Eng^{-/-}$  presentan los distintos grados de tortuosidad, con un 56% de MAV con grado 1 de tortuosidad, 28% con grado 2 y 16% con grado 3 (Figura 27C). Según nuestro análisis estos resultados son estadísticamente significativos.



**Figura 22: Análisis de los grados de tortuosidad de MAV en los ratones control y  $Eng^{-/-}$ .** A) Microfotografías representativas de los grados de tortuosidad de los vasos perfundidos con látex; B) Cuantificación del porcentaje de los distintos grados de tortuosidad de las MAV en los ratones control y  $Eng^{-/-}$ ; C) Cuantificación del porcentaje de gravedad de las MAV según la tortuosidad en los ratones control y  $Eng^{-/-}$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; Test de contingencia, heridas de los ratones control (n=39) y heridas de los ratones  $Eng^{-/-}$  (n=44).

Tras comprobar las diferencias observadas visualmente, nos pareció relevante estudiar la complejidad de las estructuras vasculares.

Dentro de este estudio, analizamos el ratio de perímetro frente al área ocupada por los vasos perfundidos con látex en los dos genotipos en estudio.

El ratio de perímetro frente al área ocupada por un vaso sanguíneo es una medida que nos ayuda a comprender la forma y estructura del vaso. Un aumento de este ratio se podría correlacionar con mayor grado de tortuosidad de los vasos.

Cuando analizamos el ratio perímetro/área de los vasos del entorno de la herida, comprobamos que los ratones *Eng<sup>-/-</sup>* presentan mayor ratio cuando comparado con el grupo control, lo que podría significar que estos vasos son más complejos y tortuosos, es decir, que tienen más giros en su recorrido manteniendo el área de su lumen (Figura 28A).

Por otro lado, recurrimos al software *Fiji* y su herramienta *Skeletonize*, que nos permite corroborar el análisis subjetivo previamente realizado, ya que, al convertir los vasos en esqueletos digitales, proporciona varios parámetros de análisis de la estructura de la vasculatura.

Para caracterizar los diferentes grados de MAVs observadas y estudiar sus diferencias estructurales hemos agrupado las malformaciones según su grado de complejidad como Grado 1-2 o Grado 3-4 y lo hemos comparado con la ausencia de MAV.

El análisis nos identifica diferentes parámetros de complejidad del esqueleto digital generado por el software *Fiji*, tras ello, seleccionamos los parámetros del esqueleto que consideramos que se podían correlacionar con los distintos grados de MAV.

En concreto, seleccionamos el número de ramas, la longitud media de las ramas y los puntos triples, es decir, los puntos que se encuentra unidos a tres ramas distintas y los comparamos con la clasificación de grados de MAV que habíamos realizado.

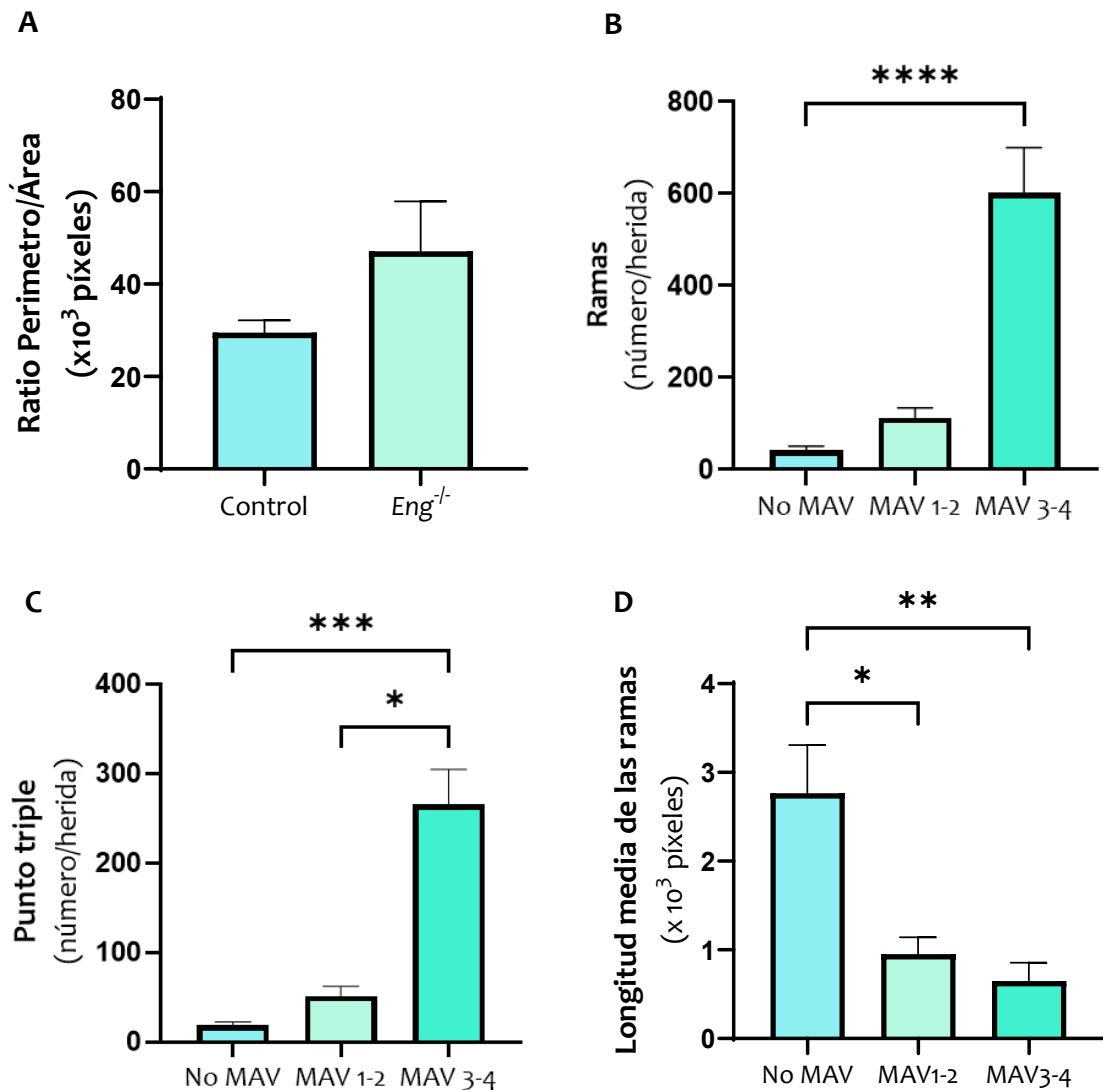
Como resultado, observamos que las MAV de grados más graves, es decir de grados 3 y 4, presentan vasos más ramificados (Figura 28B) y con ramas más

cortas cuando comparamos con la ausencia de MAV (Figura 28D). Mientras que en MAVs de grados 1 y 2, los vasos presentan un aumento en el número de ramas (Figura 28B) y una disminución de la longitud media de las ramas cuando se compara con los vasos de ausencia de MAVs (Figura 28D). Todas las diferencias son estadísticamente significativas.

Con respecto a los puntos triples, observamos que ambos grados 1 y 2 y grados 3 y 4 presentan un aumento de puntos triples cuando comparados con los vasos que no presentan MAVs, que en el caso de las MAVs de cariz más grave esta diferencia estadísticamente significativa (Figura 28C).

Los vasos que no presentan malformaciones arteriovenosas se caracterizan por ser más largos (Figura 28D), con menos ramificaciones (Figura 28B) y menos puntos triples (Figura 28C).

Por tanto, gracias a este análisis podríamos diferenciar objetivamente los grados de gravedad de las MAV y estudiar si el tratamiento posteriormente administrado, podría actuar en alguno de estos parámetros, lo que significaría que se está reduciendo la gravedad de las MAVs.



**Figura 23:** Análisis de varios parámetros de complejidad en los distintos grados de MAV. A) Cuantificación del ratio de perímetro/área en los ratones control y *Eng*<sup>-/-</sup>, test estadístico U de Mann-Whitney, heridas de los ratones control (n=39) y heridas de los ratones *Eng*<sup>-/-</sup> (n=44); B) Cuantificación del número de ramas en los distintos grados de MAV \*\*\*\*p<0,0001; C) Cuantificación del número de puntos triples en los distintos grados de MAV \*\*\*p<0,001 y \*p<0,05; D) Cuantificación de la longitud media de las ramas en los distintos grados de MAV \*\*p<0,01 y \*p<0,05; Test estadístico Kruskal Wallis, No MAV (n= 8), MAV 1-2 (n= 9), MAV 3-4 (n= 7), (B, C y D).

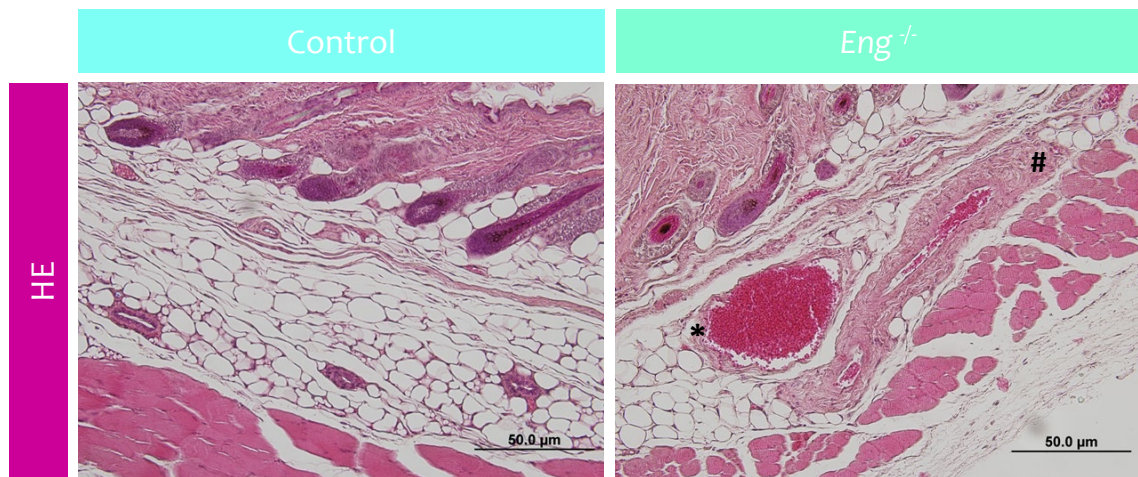
### 1.3. Análisis microscópico y caracterización histológica de los vasos del entorno de la herida cutánea

A continuación, nos propusimos analizar microscópicamente la organización y estructura de los vasos de la piel de la espalda de los ratones 10 días tras la generación de las heridas cutáneas.

Histológicamente, una malformación arteriovenosa se puede identificar por la presencia de vasos sanguíneos dilatados y anómalos, así como, una disminución en el número de capas de los vasos o una incapacidad de definirlos y distinguirlos. Al mismo tiempo, se puede observar una proliferación anómala de las células endoteliales en las paredes de los vasos, que podrían dar lugar a un aumento del grosor de la pared y por otra parte se podrían observar cambios degenerativos, que pueden incluir fibrosis y acumulación de tejido conectivo y deposición de sustancias anormales como el calcio. Además, en algunos casos puede ser posible la identificación de una comunicación directa entre las arterias y las venas sin la presencia de capilares intermedios.

Para llevar a cabo un estudio estructural de los vasos de los ratones en estudio y poder investigar los criterios identificativos de las malformaciones arteriovenosas, en primer lugar, realizamos la tinción de rutina, Hematoxilina-Eosina, que permite tener una visión global del tejido, así como estudiar la disposición y organización de los vasos en el tejido.

En un primer análisis, observamos la presencia de vasos de grandes dimensiones, mayoritariamente con una pared engrosada (#) y en algunos casos es posible distinguir el aspecto tortuoso (\*) de estos cuando comparados con las muestras control (Figura 29).



**Figura 24:** Microfotografías representativas de la tinción de Hematoxilina-Eosina en los ratones control (izquierda) y  $Eng^{-/-}$  (derecha). La almohadilla (#) señala la pared engrosada del vaso sanguíneo y el asterisco (\*) evidencia el aspecto tortuoso del vaso. La línea negra representa la escala y se corresponde con 50  $\mu\text{m}$  en las fotos de la fila superior y 20  $\mu\text{m}$  en las fotos de la fila inferior. Heridas de los ratones control (n=24) y heridas de los ratones  $Eng^{-/-}$  (n=38).

Además, teniendo en cuenta las alteraciones de la pared vascular que ocurren en la remodelación de los vasos cuando son sometidos a una herida, quisimos estudiar la composición de fibras generadas en el proceso de regeneración de la herida, así como la estructura de su lámina basal o de la matriz formada alrededor de la MAV.

Para ello, recurrimos a las técnicas de Weigert Van Gieson y de Tricrómico de Masson, donde analizamos los componentes de la lámina basal y la matriz extracelular y por otro lado la tinción de inmunohistoquímica de  $\alpha$ -SMA que nos permite analizar la capa muscular de los vasos (Figura 30).

Como las arterias y las venas están compuestas por tres capas, la capa adventicia, la capa media y la capa intima, constituidas por células distintas, es necesaria una tinción que permita identificar y estudiar los distintos componentes.

La capa intima está constituida por células endoteliales distribuidas de forma continua y respaldadas por una capa subendotelial de tejido conectivo y células de soporte. Mientras, que la capa media está compuesta por células musculares, tejido elástico y conectivo y la capa externa es la capa más externa y gruesa

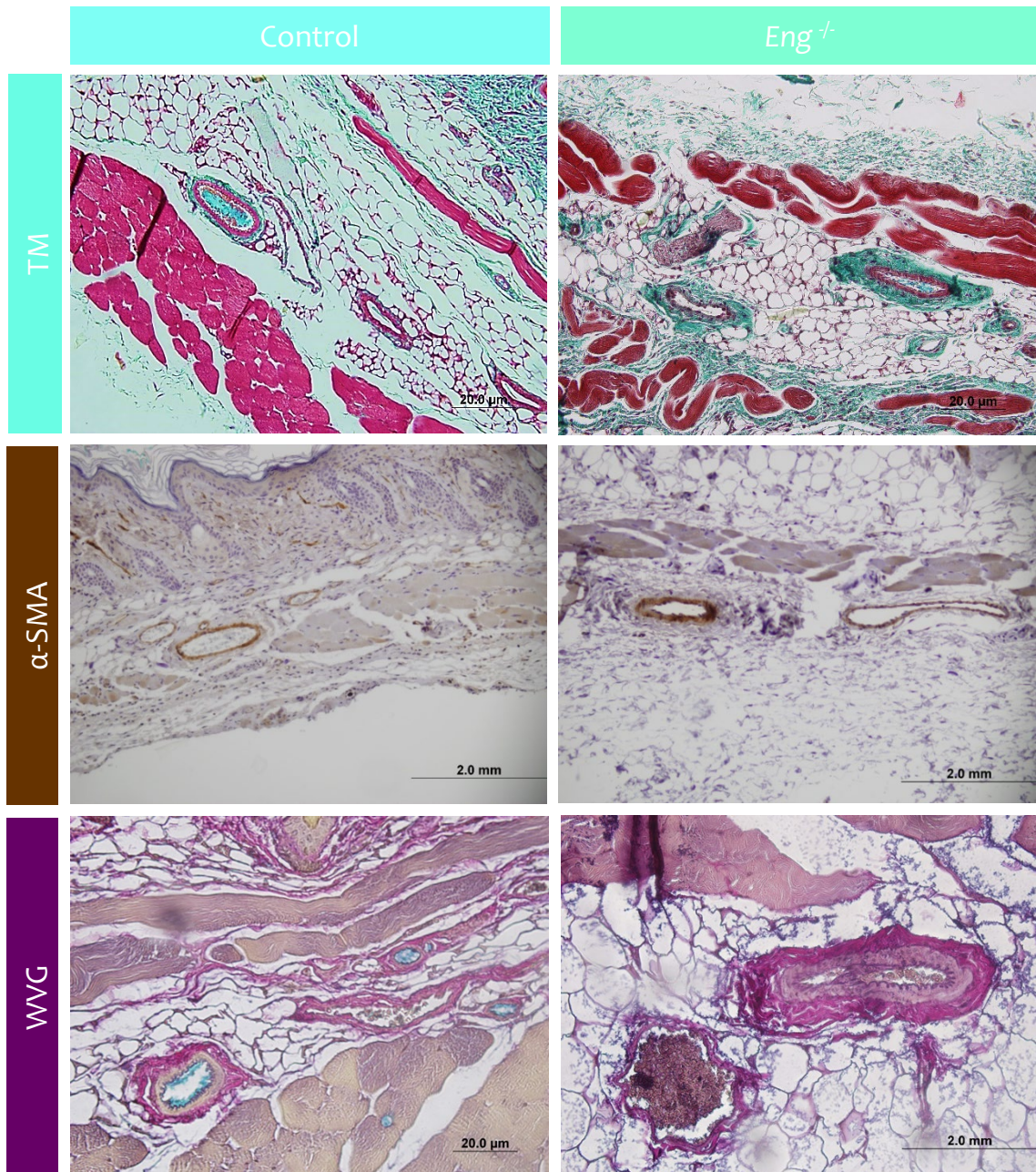
compuesta completamente de fibras de tejido conectivo y rodeado de una lámina elástica.

Concretamente, las técnicas de Tricrómico de Masson y de Weigert-Van Gieson permiten examinar la cantidad y distribución de las fibras elásticas y de colágeno y evaluar el grado de fibrosis, lo que ayuda a comprender la progresión de las malformaciones vasculares y sus cambios estructurales.

Mediante la tinción de WVG, observamos que los vasos contienen escasas fibras elásticas, teñidas de morado, en este momento de la remodelación tisular, lo que es característico a los 10 días de cicatrización de una herida cutánea (Figura 30).

Por otro lado, aunque se ha descrito que algunas arterias de las malformaciones arteriovenosas podrían mostrar ruptura de la lámina elástica interna resaltada por la tinción de WVG, nosotros no hemos podido observarlo en esta etapa de la cicatrización de la herida.

Por otra parte, mediante la tinción de Tricrómico de Masson en el modelo de MAV, observamos un aumento de las fibras de colágeno, teñidas de verde, consistente con un aumento de la capa fibrótica que se suele observar en las malformaciones arteriovenosas en comparación con los tejidos control (Figura 30). Lo mismo sucede con la capa muscular, resaltada por la tinción de inmunohistoquímica que detecta la proteína  $\alpha$ -SMA y marca en marrón las células del músculo liso vascular que se encuentran en la capa media de pared de los vasos (Figura 30).



**Figura 25:** Microfotografías representativas de la tinción de Tricrómico de Masson (fila superior), de la tinción inmunohistoquímica de  $\alpha$ -SMA (fila intermedia) y de la tinción de Weigert-Van Gieson (fila inferior) en los ratones control (izquierda) y  $Eng^{-/-}$  (derecha). La línea negra representa la escala y se corresponde con 20  $\mu$ m en todas las fotos. Heridas de los ratones control (n=24) y heridas de los ratones  $Eng^{-/-}$  (n=38)

(El resto del contenido no está aún disponible para su lectura debido a que se encuentra en trámites de solicitud de patente. Será publicado una vez obtenida la autorización pertinente.)



# Discusión



La Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria es una enfermedad rara, genética autosómica dominante que afecta a 1 de cada 5000-8000 personas. Esta enfermedad está causada en el 90% de los casos por mutaciones en endoglinina o *ALK1* (Shovlin and Letarte, 1999).

Clínicamente la HHT se caracteriza por la presencia de epistaxis recurrentes y espontáneas, sangrados gastrointestinales, telangiectasias en piel y mucosas y, en cierto número de pacientes, malformaciones arteriovenosas que pueden aparecer en pulmones, hígado, cerebro o médula espinal (Peery 1987; Shovlin 2010). La presencia de estas malformaciones vasculares tiene un gran impacto en la esperanza y calidad de vida de los pacientes, ya que la rotura de las estas malformaciones en la mucosa nasal y gastrointestinal origina los sangrados espontáneos, que son el síntoma más frecuente en estos pacientes. Por otra parte, la presencia de grandes malformaciones arteriovenosas en órganos internos son la manifestación clínica más grave de la enfermedad, ya que pueden comprometer la vida de los pacientes.

Aunque se han desarrollado diferentes enfoques de manejo o tratamiento de los pacientes de HHT, que se centran en controlar las hemorragias, tratar las complicaciones individuales y mejorar la calidad de vida de los pacientes, aún no existe un tratamiento específico, eficaz y definitivo para la HHT (Robert et al., 2020; Faughnan et al., 2020). La dificultad para el desarrollo de terapias reside en la amplia variabilidad en cuanto a la gravedad o su presentación clínica entre los diferentes pacientes, incluso dentro de la misma familia con mutaciones genéticas idénticas. Además, al tratarse de una enfermedad rara, la realización de grandes ensayos clínicos y la obtención de datos suficientes para evaluar la eficacia de diferentes enfoques de tratamiento se ve dificultada.

Teniendo en cuenta que los síntomas clínicos derivan de la presencia de diferentes tipos de malformaciones vasculares se pone de relevancia la importancia de la búsqueda de tratamientos que permitan evitar la aparición de las mismas o revertir las existentes. Sin embargo, la complejidad de las malformaciones arteriovenosas, por su ubicación y tamaño variable, hace que el tratamiento sea

desafiante (Shovlin, 2010; Noel et al., 2022). Especialmente porque los tratamientos directos mediante embolización vascular, que son los más efectivos actualmente para el tratamiento de las malformaciones vasculares, no logran ser definitivos y pueden provocar la reaparición de nuevas malformaciones, principalmente en el contexto de malformaciones en la mucosa nasal.

Nuestra hipótesis es que

una terapia efectiva para evitar el desarrollo, o la gravedad, de las malformaciones vasculares que presentan los pacientes de HHT y que dan lugar a sus síntomas clínicos. Esto permitiría el tratamiento de los pacientes en contextos en que el riesgo de aparición de nuevas malformaciones vasculares sea muy elevado.

Sin embargo, para poder comprobar esta hipótesis, es necesario disponer de un modelo murino de desarrollo de malformaciones arteriovenosas que sea reproducible y medible.

## 1. El estímulo angiogénico/inflamatorio mediante la generación de heridas cutáneas en los ratones deficientes de endogлина es un modelo reproducible del desarrollo de malformaciones vasculares

Está ampliamente descrito que las mutaciones en endogлина o *ALK1* predisponen a la aparición de las malformaciones vasculares que causan HHT. Concretamente, las mutaciones de pérdida de función en estos genes conducen al desarrollo y remodelación anormal de los vasos sanguíneos, lo que puede resultar en la formación de una MAV. El mecanismo exacto por el cual esto ocurre no se comprende por completo, pero se cree que la disminución de la expresión de endogлина o *ALK1* del endotelio vascular es un requisito previo para la formación de estas lesiones (Mallet et al., 2015; Galaris et al., 2021).

No obstante, la haploinsuficiencia de estos genes, que es la condición que presentan los pacientes de HHT, por sí sola no puede explicar la generación localizada de lesiones vasculares en pacientes con HHT. (Bernabeu *et al.*, 2020). En los ratones heterocigotos para endogлина o *ALK1* se observó que la formación de MAVs ocurría en menos de la mitad de los animales y de manera impredecible. Además, se vio que el desarrollo de estas lesiones dependía del fondo genético, ya que en los ratones de fondo genético C57 estas lesiones eran menos frecuentes que en el fondo 129/Ola (Srinivasan *et al.*, 2003; Zhu, Zhang and Su, 2016). Por otra parte, los ratones *knockout* de estos genes resultan en letalidad embrionaria, por lo que no es viable el estudio del desarrollo de MAVs en estos ratones, sino que sería necesario el uso de ratones *knockout* condicionales en los que se pueda eliminar la expresión del gen con algún estímulo y cuando el ratón ya es adulto. Observaciones realizadas en estudios con estos modelos de ratones *knockout* condicionales, revelaban que las manifestaciones clínicas estaban limitadas a sitios donde existía un entorno proangiogénico o inflamatorio y no consistían en un modelo reproducible de estas lesiones (Park *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2014; Garrido-Martin *et al.*, 2014).

A partir de estos resultados se desarrolló la teoría del tercer evento o “*third hit*” que dicta que es necesario un estímulo proangiogénico o inflamatorio, junto con la pérdida completa de expresión de endogлина o *ALK1*, para desarrollar las manifestaciones clínicas de la enfermedad (Mahmoud *et al.*, 2010; Tual-Chalot, Oh and Arthur, 2015).

Teniendo en cuenta todo ello, para la realización de este estudio hemos utilizado un modelo murino *knockout* condicional de endogлина inducible por tamoxifeno al que le provocamos un estímulo angiogénico/inflamatorio mediante la realización de una herida cutánea en el lomo de los ratones para estudiar el desarrollo de las malformaciones arteriovenosas. El estudio se ha realizado con las muestras recogidas tras diez días de proceso de cicatrización de la herida y la subsecuente angiogénesis. En un proceso de cicatrización de herida, se sabe que la angiogénesis ocurre entre el tercer y sexto día, por lo que diez días tras la

generación de la herida podemos observar los vasos recién formados (Gantwerker and Hom, 2011; Medina, Villanueva de la Torre and Villadiego, 2015). Este modelo ya ha sido utilizado por otros investigadores que observaron que la perfusión con látex permitía observar los vasos normales y, especialmente, las malformaciones vasculares (Garrido-Martin *et al.*, 2014). La perfusión de los vasos sanguíneos mediante la administración de látex líquido nos permite la visualización de los vasos de mayores dimensiones y su cuantificación, ya que esta sustancia es capaz de penetrar los vasos y mantener su estructura sin deteriorarse con el tiempo.

Los resultados de nuestro estudio, en concordancia con los obtenidos por Garrido-Martín y colaboradores (Garrido-Martin *et al.*, 2014), muestran que la mayoría de los ratones *Eng*<sup>-/-</sup> desarrollan malformaciones arteriovenosas cuando se provoca un estímulo angiogénico/inflamatorio mediante la realización de heridas cutáneas. Así, este modelo murino es un modelo reproducible que imita las malformaciones arteriovenosas que ocurren en los pacientes de HHT. La obtención de un modelo reproducible es esencial para el estudio de la formación y desarrollo de malformaciones vasculares. Sin embargo, en su estudio esos investigadores se limitaron a mostrar la presencia o ausencia de malformaciones sin cuantificar su gravedad, algo que puede ser determinante para poder estudiar el efecto de un fármaco en el desarrollo de las mismas.

Clínicamente, las malformaciones arteriovenosas son clasificadas en cuatro grados en base a su aspecto clínico y severidad, lo que origina un pronóstico distinto y diferentes recomendaciones terapéuticas. La gravedad de estas lesiones se basa en su estructura y tamaño (Neto CASF and Durans M., 2019). Otra característica de la gravedad de las malformaciones es su tortuosidad. Cuantificamos subjetivamente la tortuosidad de los vasos, atribuyéndoles valores del 1 al 3, en los que 1 se corresponde con poca tortuosidad, el grado 2 con alguna tortuosidad y el grado 3 con mucha tortuosidad.

Nuestros resultados demuestran que con el modelo llevado a cabo es posible aplicar estas clasificaciones lo que nos permite estimar la gravedad de las

malformaciones generadas y nos permitiría estudiar el efecto de un fármaco, no sólo sobre la aparición, sino también sobre la gravedad de las malformaciones.

Sin embargo, estas clasificaciones no dejan de estar basadas en criterios subjetivos. Por esa razón hemos querido realizar un estudio objetivo de las características de los vasos formados en los ratones deficientes de endoglina y sus controles después de la realización de las heridas cutáneas. Para ello, como primera aproximación, hemos llevado a cabo la cuantificación del área vascular del entorno de la herida, mediante la determinación del número de píxeles azules que se corresponden con los vasos sanguíneos perfundidos con látex y, por otro lado, hemos tomado cinco medidas aleatorias del diámetro de los vasos de cada fotografía.

Nuestros resultados demuestran que los ratones deficientes de endoglina presentan un aumento significativo en el área vascular con vasos de mayor calibre con respecto a los vasos de los ratones control. Por otra parte, hemos observado también un aumento de la proporción perímetro frente al área ocupada en los vasos sanguíneos formados en nuestro modelo. Entendemos que esta medida es una aproximación más objetiva a la tortuosidad de los vasos ya que, tendrían más giros en su recorrido manteniendo el área de su lumen.

Otra aproximación que hemos utilizado se basa en el estudio complejo de la estructura de los vasos formados. Para ello, se utilizó el software *Fiji* que dispone de una herramienta denominada “*Skeletonize (2D/3D)*”, que convierte el árbol vascular en un esqueleto digital. Sobre este esqueleto digitalizado de las estructuras tridimensionales, la herramienta “*Analyze Skeleton (2D/3D)*” del software dibuja y recuenta varios parámetros relativos al número de ramas, la longitud media o máxima de las ramas, el número de puntos de unión entre ramas, y la longitud de las estructuras encontradas, entre otros. Con la finalidad de estudiar objetivamente la gravedad de las malformaciones observadas, hemos buscado qué parámetros se asocian con los grados clínicos más elevados de las malformaciones, ya que un mayor grado clínico de estas malformaciones se relaciona directamente con peor pronóstico.

Al comparar los resultados obtenidos en esos parámetros entre las malformaciones de grado 1 y 2 con las de grado 3 y 4 o con la ausencia de ellas, hemos encontrado diferencias significativas en varios parámetros de complejidad del esqueleto vascular, concretamente, el número de ramas, la longitud media de las ramas y los puntos triples (puntos de unión entre tres ramas diferentes). Las malformaciones con mayor grado de severidad presentan vasos significativamente más ramificados, ramas de menor longitud media y mayor número de puntos triples. Por lo tanto, la presencia, en una situación clínica/experimental o en presencia/ausencia de un tratamiento, de estructuras más ramificadas, con menor longitud media y mayor número de puntos triples se correlacionaría con una mayor gravedad de la lesión.

En conjunto, nuestros resultados demuestran que el modelo propuesto, no sólo es reproducible e imita las malformaciones observadas en los pacientes, sino que ofrece la posibilidad de una valoración macroscópica que nos permite clasificar las malformaciones en función de su gravedad.

(El resto del contenido no está aún disponible para su lectura debido a que se encuentra en trámites de solicitud de patente. Será publicado una vez obtenida la autorización pertinente.)





# Conclusiones



De los resultados presentados en este trabajo llegamos a las siguientes conclusiones:

1. La realización de heridas cutáneas, lo que provoca un estímulo angiogénico/inflamatorio, en ratones con ausencia de expresión de endoglin es un modelo reproducible y medible de la generación de malformaciones vasculares.
2. El tratamiento [REDACTED] en el modelo murino de malformaciones arteriovenosas reduce la frecuencia de aparición y la gravedad de las malformaciones vasculares.
3. El tratamiento [REDACTED] resulta en una disminución de la capa muscular y fibrótica de los vasos de mayores dimensiones que se generan en el modelo murino de malformaciones arteriovenosas.
4. El tratamiento [REDACTED] provoca cambios en el ambiente inmune del área donde se están desarrollando las malformaciones vasculares, que se evidencia por un aumento significativo de macrófagos perivasculares totales.



# Bibliografía



[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[Redacted text block 1]

[Redacted text block 2]

[Redacted text block 3]

[Redacted text block 4]

[Redacted text block 5]

[Redacted text block 6]

[Redacted text block 7]

[Redacted text block 8]

[Redacted text block 9]

[Redacted text block 10]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]



[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[Redacted text block 1]

[Redacted text block 2]

[Redacted text block 3]

[Redacted text block 4]

[Redacted text block 5]

[Redacted text block 6]

[Redacted text block 7]

[Redacted text block 8]

[Redacted text block 9]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]



[Redacted text block 1]

[Redacted text block 2]

[Redacted text block 3]

[Redacted text block 4]

[Redacted text block 5]

[Redacted text block 6]

[Redacted text block 7]

[Redacted text block 8]

[Redacted text block 9]



[Redacted text block 1]

[Redacted text block 2]

[Redacted text block 3]

[Redacted text block 4]

[Redacted text block 5]

[Redacted text block 6]

[Redacted text block 7]

[Redacted text block 8]

[Redacted text block 9]

[Redacted text block 10]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]



[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[Redacted text block 1]

[Redacted text block 2]

[Redacted text block 3]

[Redacted text block 4]

[Redacted text block 5]

[Redacted text block 6]

[Redacted text block 7]

[Redacted text block 8]

[Redacted text block 9]

[Redacted text block 10]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]



[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

|