

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**Análisis de los marcadores de angiogénesis en las varices primarias y recurrentes. Impacto de la Endoglina.**

**JOSE ANTONIO CARNICERO MARTÍNEZ**

**2022**



## **Título de la tesis doctoral**

**Análisis de los marcadores de angiogénesis en las varices primarias y recurrentes. Impacto de la Endoglina.**

### **Doctorando**

D José Antonio Carnicero Martínez

NIF: 30600290D

### **Directores**

Dr.D. Francisco S.Lozano Sánchez

Dr D. Miguel Pericacho Bustos

### **Programa**

Cirugía y Odontología.

Universidad de Salamanca





# VNiVERSiDAD D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

El presente trabajo “Análisis de los marcadores de angiogénesis en las varices primarias y recurrentes. Impacto de la Endogлина” recogido en la presenta memoria ha sido realizado por José Antonio Carnicero Martínez, bajo la dirección del Profesor D. Francisco Santiago Lozano Sánchez, Catedrático de Angiología y Cirugía Vasculard de la Universidad de Salamanca y del Dr. Miguel Pericacho Bustos, Profesor del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

VºBº El Director

Fdº Francisco S. Lozano Sánchez

VºBº El Director

Fdº Miguel Pericacho Bustos



El trabajo presentado en esta tesis doctoral ha sido realizado en el Servicio de Angiología y Cirugía Vascular del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca (CAUSA) y en el laboratorio del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca (USAL), con la colaboración del Biobanco del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), gracias a la financiación concedida por la Gerencia Regional de Salud en el Expediente GRS 2047/A/19.







*“En la parte inferior del escalón, hacia la derecha, vi una pequeña esfera tornasolada, de casi intolerable fulgor. Al principio la creí giratoria; luego comprendí que ese movimiento era una ilusión producida por los vertiginosos espectáculos que encerraba. El diámetro del Aleph sería de dos o tres centímetros, pero el espacio cósmico estaba ahí, sin disminución de tamaño. Cada cosa (la luna del espejo, digamos) era infinitas cosas, porque yo claramente la veía desde todos los puntos del universo. Vi el populoso mar, vi el alba y la tarde, vi las muchedumbres de América, vi una plateada telaraña en el centro de una negra pirámide, vi un laberinto roto (era Londres), vi interminables ojos inmediatos escrutándose en mí como en un espejo, vi todos los espejos del planeta y ninguno me reflejó, vi en un traspatio de la calle Soler las mismas baldosas que hace treinta años vi en el zaguán de una casa en Fray Bentos, vi racimos, nieve, tabaco, vetas de metal, vapor de agua, vi convexos desiertos ecuatoriales y cada uno de sus granos de arena, vi en Inverness a una mujer que no olvidaré, vi la violenta cabellera, el altivo cuerpo, vi un cáncer en el pecho, vi un círculo de tierra seca en una vereda, donde antes hubo un árbol, vi una quinta de Adrogué, un ejemplar de la primera versión inglesa de Plinio, la de Philemon Holland, vi a un tiempo cada letra de cada página (de chico, yo solía maravillarme de que las letras de un volumen cerrado no se mezclaran y perdieran en el curso de la noche), vi la noche y el día contemporáneo, vi un poniente en Querétaro que parecía reflejar el color de una rosa en Bengala, vi mi dormitorio sin nadie, vi en un gabinete de Alkmaar un globo terráqueo entre dos espejos que lo multiplican sin fin, vi caballos de crin arremolinada, en una playa del Mar Caspio en el alba, vi la delicada osatura de una mano, vi a los sobrevivientes de una batalla, enviando tarjetas postales, vi en un escaparate de Mirzapur una baraja española, vi las sombras oblicuas de unos helechos en el suelo de un invernáculo, vi tigres, émbolos, bisontes, marejadas y ejércitos, vi todas las hormigas que hay en latierra, vi un astrolabio persa, vi en un cajón del escritorio (y la letra me hizo temblar) cartas obscenas, increíbles, precisas, que Beatriz había dirigido a Carlos Argentino, vi un adorado monumento en la Chacarita, vi la reliquia atroz de lo que deliciosamente había sido Beatriz Viterbo, vi la circulación de mi oscura sangre, vi el engranaje del amor y la modificación de la muerte, vi el Aleph, desde todos los puntos, vi en el Aleph la tierra, y en la tierra otra vez el Aleph y en el Aleph la tierra, vi mi cara y mis vísceras, vi tu cara, y sentí vértigo y lloré, porque mis ojos habían visto ese objeto secreto y conjetural, cuyo nombre usurpan los hombres, pero que ningún hombre ha mirado: el inconcebible universo.”*

Jorge Luis Borges, *El Aleph*. Buenos Aires 1949.



## **AGRADECIMIENTOS**

A mis directores el Dr Francisco Lozano y el Dr Miguel Pericacho por la paciencia y el apoyo de “quienes plantan los árboles en cuya sombra muchos nos refugiamos”.

A mis compañeros de Servicio en Angiología y Cirugía Vascular por su ayuda... “saber pedir ayuda cuando se necesita y saber ofrecerla sin esperar nada a cambio”.

A la Enfermería del Servicio de Angiología y Cirugía Vascular en sus diferentes dependencias y a la Enfermería de la Unidad de Cirugía Mayor Ambulatoria (CMA) por “saber conjugar el verbo condescender”.

A Celadores y Personal Administrativo del Hospital de Salamanca por su colaboración desinteresada añadiendo tareas a las ya habituales de quienes “reinan en la tramoya”.

Al personal del Biobanco del IBSAL, y al personal de laboratorio, con mención especial para Lucía Méndez por su generosidad y profesionalidad, sin quienes nada de esto hubiese sido posible.

A esta ciudad, y en particular a quienes han participado como pacientes en este trabajo. Gracias.



ÍNDICE



## ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	3
1.2 STATUS QUO DE LAS TÉCNICAS TERAPEÚTICAS .....	8
1.3 EL ESTADO ACTUAL A NIVEL BIOMOLECULAR .....	12
1.4 ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DE LA PARED VENOSA.....	13
1.5 ETIOLOGÍA DE LA INSUFICIENCIA VENOSA CRÓNICA VARICOSA.....	16
1.5.1 Teorías hemodinámicas. El papel de la presión venosa y del <i>shear stress</i> .....	18
1.5.2 Teorías parietales. Cambios estructurales de la pared venosa.....	20
1.5.3 Aspectos genéticos.....	25
1.5.4 Senescencia endotelial.....	26
1.6 RECIDIVA VARICOSA.....	27
1.7 ANGIOGÉNESIS.....	31
1.7.1 Etapas angiogénicas	
1. Activación endotelial: <i>sprouting</i> .....	34
2. Progresión: crecimiento del sprout.....	35
3. Resolución.....	36
4. Maduración.....	36
1.8 BIOMARCADORES EN ANGIOGÉNESIS	
1.8.1 Factor transcripcional inducible por hipoxia (HIF).....	38
1.8.2 Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).....	42
1.8.3 VEGF receptores.....	44
1. Efectos del VEGF en la angiogénesis.....	45
2. VEGF y patogénesis.....	47

1.8.4 ENDOGLINA

1. Expresión y distribución celular.....	47
2. Estructura de la endogлина .....	49
3. Funciones. Regulación de la señalización TGFβ.....	51
4. Expresión en tejidos neoangiogénicos.....	53
5. Endogлина en el reclutamiento de progenitores endoteliales.....	55
6. Endogлина en la inflamación y en la insuficiencia venosa crónica.....	55

1.9 NEOANGIOGÉNESIS Y CICATRIZACIÓN.....	57
--	----

**II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

2.1 JUSTIFICACIÓN.....	63
2.2 HIPÓTESIS.....	63
2.3 OBJETIVOS.....	64

**III. MATERIAL Y MÉTODOS**

3.1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	69
3.1.1 GRUPO 1: GRUPO CONTROL.....	70
3.1.2 GRUPO 2: PACIENTES CON VARICES PRIMARIAS.....	71
3.1.3 GRUPO 3: PACIENTES CON VARICES RECIDIVADAS.....	72
3.2 METODOLOGÍA Y PROCESAMIENTO DE LAS BIOPSIAS.....	74
3.2.1 ANÁLISIS PCR A TIEMPO REAL o qPCR	
1. Extracción y cuantificación del RNA.....	75
2 Retrotranscripción.....	76
3 PCR cuantitativa.qPCR a tiempo real .....	76



3.3 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SANGRE .....	83
3.3.1 ANÁLISIS LUMINEX DE BIOMARCADORES EN SUERO.....	83
3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	87

#### **IV. RESULTADOS**

4.1 EXPRESIÓN DE MARCADORES EN BIOPSIA DE PARED VENOSA.....	91
4.1.1 EXPRESIÓN DE BIOMARCADORES EN BIOPSIAS DE LA UNIÓN SAFENOFEMORAL .....	91
4.1.2 EXPRESIÓN DE BIOMARCADORES EN MUESTRAS DISTALES .....	94
4.1.3 COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE BIOMARCADORES A NIVEL PROXIMAL Y DISTAL.....	96
4.2 ANÁLISIS MULTIPLEXADO. EXPRESIÓN DE BIOMARCADORES EN SUERO POR GRUPOS.....	100
4.2.1 DETERMINACIONES PREOPERATORIAS DE BIOMARCADORES EN SUERO DÍA 0 .....	100
4.2.2 DETERMINACIONES POSTOPERATORIA DE BIOMARCADORES EN SUERO.CONTROL (3 MESES).....	103
4.2.3 DETERMINACIONES COMPARADAS DE BIOMARCADORES. DIA 0/ /CONTROL 3 MESES.....	105
4.3 EXPRESIÓN DE BIOMARCADORES SEGÚN GRADO CLÍNICO DE CEAP...	108
4.3.1 EXPRESIÓN TISULAR PROXIMAL DE BIOMARCADORES SEGÚN GRADO CEAP.....	109
4.3.2 EXPRESIÓN TISULAR DISTAL DE BIOMARCADORES SEGÚN GRADO CEAP.....	110
4.3.3 EXPRESIÓN TISULAR DE BIOMARCADORES SEGÚN GRADO CEAP Y GRUPO DE VARICES PRIMARIAS O RECIDIVADAS.....	111
4.3.4 EXPRESIÓN SÉRICA DE BIOMARCADORES SEGÚN GRADO CEAP.....	115
4.3.5 EXPRESIÓN SÉRICA DE BIOMARCADORES SEGÚN GRADO CEAP y GRUPO DE VARICES PRIMARIAS O RECIDIVADAS.....	116

<b>V.DISCUSIÓN.....</b>	<b>115</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>125</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>129</b>
<b>VIII. ANEXOS.....</b>	<b>173</b>
1 ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	175
2 FIGURAS Y TABLAS.....	179
3 PUBLICACIONES.....	184

# **INTRODUCCIÓN**



## I.INTRODUCCIÓN

La enfermedad varicosa como expresión clínica de la insuficiencia venosa crónica es una de las patologías más frecuentes en la especie humana. El porcentaje de los adultos que presentan, en mayor o menor grado, algún síntoma de enfermedad venosa a lo largo de su vida es alto. Su prevalencia en la población española se ha calculado en torno a un 30% según los datos publicados por la Encuesta epidemiológica sobre la insuficiencia venosa en España en el estudio DETECT-IVC 2006 (Álvarez *et al.*, 2008).

Esta alta prevalencia la sitúa en el ranking Top-10 de las cirugías más frecuentemente realizadas, e igualmente se encuentra en el Top-10 de cirugías con más lista de espera en los sistemas públicos de salud (Kanwar *et al.*, 2010; Lozano *et al.*, 2014), siendo la tercera causa de inclusión en lista de espera quirúrgica en nuestro país (Giménez Gaibar, 2006).

Todo ello tiene importantes implicaciones en términos socioeconómicos en general y en términos de economía sanitaria en particular. Consume una importante cantidad de recursos sanitarios, tanto cuantificados como costes directos, ya sean como consultas médicas y tratamientos de los pacientes, o como por los costes indirectos de las incapacidades laborales. El Capítulo Español de Flebología y Linfología de la Sociedad Española de Angiología y Cirugía Vascular publicó en 2015 la Guía de Práctica Clínica en la Enfermedad Venosa Crónica. En ella se comunicaba que la baja laboral se presentaba en un 2.5% y la hospitalización en un 2% de los pacientes por enfermedad venosa evolucionada. En la Unión Europea el coste anual del tratamiento de la insuficiencia venosa crónica (IVC) representa un 2% del total del gasto sanitario. Además, el carácter progresivo de la IVC hace que problemas como las úlceras sean recurrentes y un porcentaje de los pacientes ya intervenidos presentará varices recidivadas, cuya incidencia se ve incrementada en el seguimiento.

Por otro lado, nuevas voces subrayan que la trombosis venosa superficial en miembros inferiores o tromboflebitis, considerada tradicionalmente benigna y con un curso clínico autolimitado, se correlaciona con la enfermedad tromboembólica venosa (ETEV) al poder progresar a trombosis venosa profunda y tromboembolismo pulmonar. Su presentación sobre venas varicosas es la forma más frecuente (aproximadamente aparece en un 88%), aumentando su prevalencia con la edad. Otros autores han comunicado en este sentido un 5.6% de trombosis venosa profunda (TVP) en pacientes

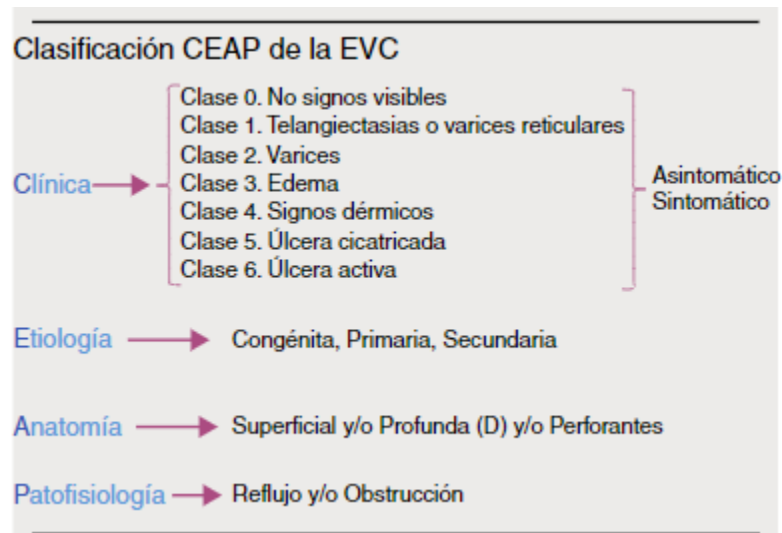
con venas varicosas, lo que supone un incremento del riesgo respecto a la cohorte de pacientes sin varices ( 0.9%), destacando la fuerte asociación de ambos diagnósticos y la necesidad de una especial atención en pacientes con varices e historia previa de ETEV o tromboembolismo pulmonar, neoplasias, ingresos recientes, o una combinación de estos factores ( Müller-Bühl *et al.*,2012 ; Chang *et al.*, 2018).

Desde el punto de vista clínico la IVC tiene un amplio rango de presentaciones clínicas. En los casos menos evolucionados puede suponer sólo una alteración estética, con aparición de telangiectasias y arañas vasculares, pudiendo progresar desarrollando varices tronculares con pesadez y/o edema de miembros inferiores en la actividad diaria. Por último, en la IVC avanzada, pueden presentar alteraciones dérmicas (dermatitis o eczema), varicorragia o úlceras, en las que el dolor y la reducción en la movilidad comprometen su calidad de vida e incluso, les pueden conducir al aislamiento social y a la depresión (Van Korlaar *et al.*, 2003).

En un intento por sistematizar esta importante diversidad de expresiones clínicas, e incorporando aspectos decisivos de su etiología, anatomía y fisiopatología en 1995 se creó bajo el auspicio de la Society for Vascular Surgery, la Clasificación CEAP. La CEAP se diseñó para disponer de un *stándard* y poder así homogeneizar las poblaciones. Tener una referencia global a la hora de describir grupos de pacientes, facilita el manejo de la información y el poder compararlos, evitando los factores de confusión que debilitan la investigación científica y (Eklof *et al.*, 2004).

Sus críticos subrayan su complejidad, ya que analiza hasta 60 variables y posibles combinaciones y aunque proporciona una valoración hemodinámica y morfológica, se trataría de una foto estática incompleta de una alteración hemodinámica, en la que el reflujo de un segmento no implica necesariamente localizar su origen (García-Gimeno *et al.*, 2010). Adicionalmente las complicaciones agudas de las varices como las varicoflebitis o los episodios de varicorragia no se detallan en el apartado de clínica CEAP.

El Servicio de Angiología y Cirugía Vascular del Hospital Universitario de Salamanca (CAUSA), donde se ha realizado parte de este trabajo, es uno de los tantos que atienden estos pacientes, en quienes determinados aspectos relacionados con la etiopatogenia de su enfermedad aún permanecen por resolver. Nos planteamos el papel que determinadas moléculas involucradas en procesos angiogénicos pueden tener en el desarrollo de la enfermedad primaria y en especial en determinados patrones de la enfermedad recidivada.



**Figura 1.** Clasificación CEAP. Guía de práctica clínica en enfermedad venosa crónica del Capítulo de Flebología y Linfología de la Sociedad Española de Angiología y Cirugía Vascular. Angiología 2015.

## 1.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS.

La enfermedad varicosa se ha descrito desde la antigüedad. Existe registro de la misma desde el 1550 a.C. en el papiro de Ebers encontrado en Egipto, donde se describen las varices y su cauterio con hierro incandescente. Su primera ilustración data del siglo IV a.C. y fue descubierta al pie de la Acrópolis ateniense.

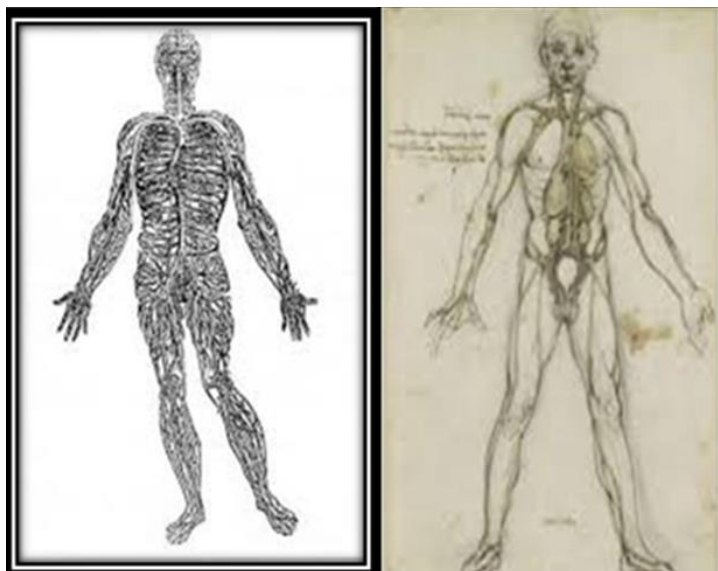


**Figura 2.** Papiro de Ebers y Tabla de la Acrópolis ateniense Siglo IV a.C.

Hipócrates de Cos (460-377 a.C.) describió en su trabajo *De ulceribus*, lo 4nconveniente de permanecer de pie cuando la úlcera esta en la pierna, y realizó la primera referencia a la terapia con paños compresivos (Browse, 1988).

La primera ligadura de los vasos sanguíneos la describieron miembros de la Escuela de Medicina de Alejandría (270 a.C.). Celso, médico de Roma (siglo I d.C.), trataba las venas varicosas mediante escisión y cauterio, y Galeno en el siglo II utilizó la ligadura de seda y la escisión con ganchos (Walsh, 1934).

En el siglo XV Leonardo da Vinci ilustró la anatomía venosa que Vesalio amplió en el siglo siguiente y Ambroise Paré describió el vendaje para el tratamiento de la úlcera venosa.



**Figura 3.** Anatomía venosa de Leonardo y Sistema venoso de Andreas Vesalio.

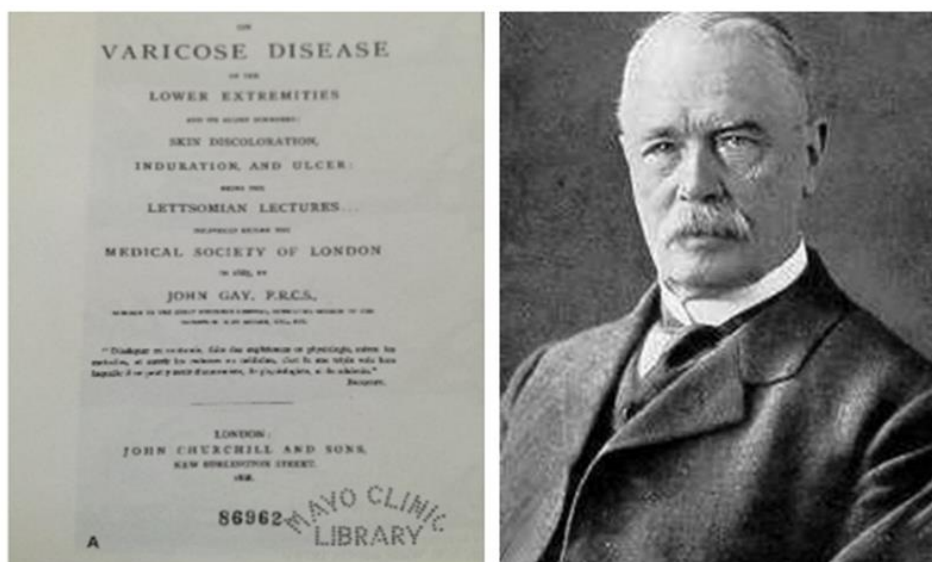
J. B. Canano fue probablemente el primero en mencionar la presencia de válvulas (Friedenwald, 1937) hasta que posteriormente H. Fabricius de Aquapendente, profesor de anatomía en Padua, fuese el primero endescribirlas en 1603. Estimulado por este trabajo, William Harvey descubrió la circulación demostrando como “la sangre se mueve en las venas de abajo hacia arriba al corazón y no de forma contraria” (Harvey, 1628).

Las investigaciones siguientes ya no sólo se limitarían a la anatomía, sino que también se enfocarían a la fisiopatología, especialmente en la enfermedad tromboembólica. Ferriar en 1810 describió un paciente con flegmasía alba dolens y Davis estableció la correlación entre flegmasía y trombosis venosa profunda TVP (Davis, 1822).



Los posteriores estudios anatómicos del sistema venoso del siglo XIX fueron ya definitivos en muchos aspectos y permitieron un mayor conocimiento sobre el tratamiento de las enfermedades venosas. Brodie describió su prueba sobre la incompetencia valvular y usó vendajes compresivos para el tratamiento de la úlcera venosa (Brodie, 1846).

La patogenia de la trombosis venosa profunda y el tromboembolismo pulmonar fue descrita por R. Virchow en su tratado *Die Cellular Pathologie*, estableciendo un cambio de paradigma para este problema (Virchow, 1860), y en 1864 el médico francés C. Pravaz inició la escleroterapia varicosa con percloruro de hierro, tras diseñar una jeringa precursora de las actuales (Tournay, 1975).



**Figura 4.** “Varicose disease” de John Gay. Fotografía de Friedrich Trendelenburg

J. Gay realizó descripciones aún más exactas de la anatomía venosa, y fue el primero en sugerir que deberían llamarse úlceras venosas, argumentando que el tratamiento de las venas varicosas producía la curación de las úlceras (Gay, 1868).

La moderna cirugía de las varices comenzó en 1806 cuando Tommaso Rimma propuso un tratamiento hemodinámico con ligadura de la vena safena interna. Esta operación fue reformulada por F. Trendelenburg, quien enunció la teoría hemodinámica “el reflujo safeno debe ser el primer paso en el control de las varices distales” que fue dominante durante años (Trendelenburg, 1891).

Las líneas en la investigación fisiopatológica pusieron el objetivo en el estudio de los registros de la presión venosa. Von Recklinghausen en 1906 realizó las primeras mediciones usando sistemas de inflado externo que monitorizaban la presión de aire para el colapso de la safena interna y con posterioridad se pudo demostrar la reducción de la presión que se registraba durante el ejercicio (Beecher, 1936). En esa misma dirección se realizaron las primeras mediciones de la presión venosa cruenta en el pie (Barber y Shatara, 1925). Las modificaciones de la presión en reposo y en el ejercicio serían corroboradas posteriormente (Pollack y Wood, 1949) pudiendo demostrarse que la reducción es significativamente menor en pacientes con enfermedad venosa y que los cambios registrados en el sistema venoso superficial eran casi idénticos a los del sistema venoso profundo por el rápido reequilibrio que se produce entre ambos (Arnoldi, 1956). El estudio se ha prolongado hasta nuestros días, disponiendo de un conocimiento extenso de la fisiología de la hipertensión venosa y la IVC en sus diferentes grados (Nicolaidis *et al.*, 1993).



**Figura 5.** Charles Horace Mayo y W.W Babcock.

La evolución en el tratamiento se aceleró cuando C.H.Mayo introdujo en 1904 el arrancamiento (en inglés “*stripping*”) con un dispositivo extraluminal. En 1905, Keller describió un stripper intraluminal, posteriormente refinado por Babcock en 1907 (Babcock, 1907). El fleboextractor era muy rígido y se perfeccionaría posteriormente haciéndolo flexible y parecido a los actuales (Myers y Smith, 1954), posibilitando un *stripping* que se ha practicado extensivamente hasta nuestros días y la intervención más frecuente de nuestra especialidad

También es destacable la contribución de R. Linton que describió la ligadura subfascial de las venas perforantes incompetentes (Linton, 1938) y de F. Cockett en la ligadura extrafascial en el tratamiento de las perforantes incompetentes en las úlceras varicosas (Cockett y Jones, 1953).

La safenectomía tradicional ha permanecido como el procedimiento de rutina hasta nuestros días y sus resultados han avalado su empleo durante décadas, presentándose como el *gold standard* frente al que se comparan el resto de alternativas terapéuticas de posterior aparición. Sin embargo, dicho procedimiento se ha asociado a complicaciones como sangrado, infección, lesión vascular, neurológica, trombosis venosa profunda, tromboflebitis superficial y altas incidencias de recidiva a cinco años.



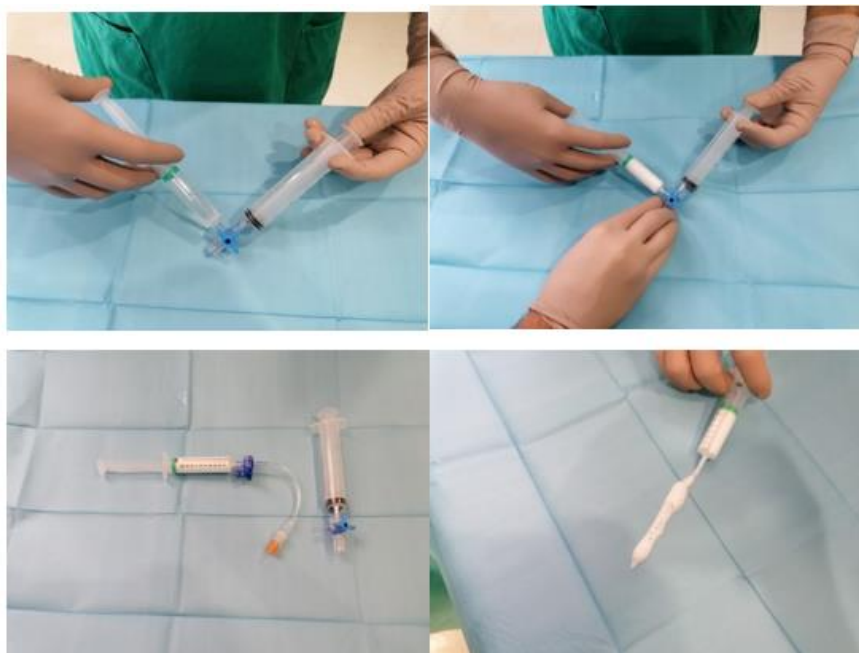
**Figura 6.** Secuencia de una safenectomía interna infragenicular. CAUSA.

Otras alternativas como la estrategia CHIVA (en francés *Cure Conservatrice et Hemodynamique de l'Insuffisance Veineuse en Ambulatoire*; Franceschi, 1988) orientada a una cura hemodinámica con un abordaje menos invasivo que la avulsión tradicional, o el *banding* de la safena interna terminal (Corcos, 1997) o las valvuloplastias o transposiciones de una vena competente (Yamaki *et al.*, 2002), o no han tenido suficiente aceptación o han resultado anecdóticas.

## 1.2 STATUS QUO DE LAS TÉCNICAS TERAPEÚTICAS

En los últimos años las aproximaciones quirúrgicas se han orientado hacia técnicas menos invasivas, con tiempos de convalecencia más cortos y con una mayor aceptación desde el punto de vista estético.

La escleroterapia con espuma (Tessari *et al.*, 2001), ha presentado gran difusión al poder ser realizada de manera ambulatoria sin anestesia. Sus resultados presentan una alta tasa de recidivas y posibles complicaciones por migración del fármaco esclerosante a la circulación sistémica, o extravasación y necrosis cutánea. Se recomienda para varices menores a 3mm, varices recidivadas o el tratamiento de perforantes insuficientes asociadas a ulceración. Como limitaciones, presenta la posibilidad de alergias a los esclerosantes y el tratamiento de los troncos safenos y varices tronculares y de gran tamaño donde su utilización exige una mayor curva de aprendizaje.



**Figura 7.** Elaboración de espuma con Polidocanol. CAUSA

Alternativamente, la generalización del ecodoppler en el estudio diagnóstico y su aplicación práctica en las técnicas terapéuticas, han posibilitado las nuevas técnicas de ablación endovenosa mediante láser o EVLA (en inglés *Endovenous Laser Ablation*; Bone Salat, 1999) o por radiofrecuencia mediante catéter o RFA (en inglés *Radio Frequency Ablation*; Goldman, 2000).

En el EVLA el mecanismo es la fototermolisis y en la RFA se recurre a la energía térmica para la ablación de la vena insuficiente. Estas técnicas endovasculares han presentado un extenso desarrollo desde finales del pasado y comienzos del presente siglo, si bien su generalización no es tan extensiva en nuestro entorno. La relación costo-beneficio en estas nuevas técnicas es muy relevante al soportar en muchos casos su coste los servicios públicos y estar sus resultados menos contrastados que los disponibles en las técnicas tradicionales.

En la actualidad la evaluación preoperatoria con ecodoppler permite un estudio anatómico y hemodinámico pormenorizados para decidir una estrategia individualizada. Esto debiera permitir una mejoría en los resultados al reducirse los errores tácticos por un incorrecto planteamiento diagnóstico y terapéutico y así poder reducir las recurrencias.

La cirugía tradicional convencional se ha basado en la ligadura y sección del confluente safenofemoral con eliminación de todas sus ramas para reducir las recurrencias futuras. Pese a haberla realizado correctamente de acuerdo a los estándares (Perkins *et al.*, 2009), la propia disección sería responsable de una mayor neovascularización local, que sería una de las principales causas de recidiva, (Perrin *et al.*, 2006; Brake *et al.*, 2013). Para reducir la recurrencia, el *stripping* safeno prevendría la reconexión desde la neovascularización inguinal al eliminar el tronco residual de la safena del muslo. En este sentido y de forma clásica, el *stripping* safeno hasta el tobillo se justificaba para reducir así las recurrencias.

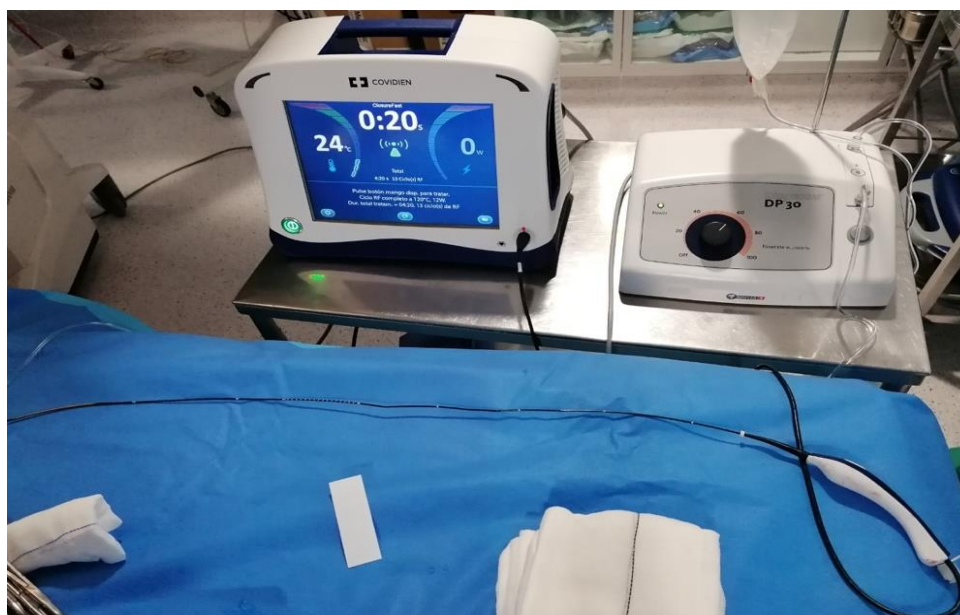
Las complicaciones de la cirugía standard se han comunicado hasta en un 18-20%. Las complicaciones de la herida como infección, hematomas y absceso hasta 3-10%. La incidencia de TVP es del 0.5% y de TEP de 1:600 pacientes intervenidos, y las complicaciones vasculares muy raras y más frecuentes las que afectan a la vena femoral (Critchley *et al.*, 1997). Por el contrario, la incidencia de lesión del nervio safeno se ha comunicado hasta en el 39% en pacientes a quienes se indicó la safenectomía completa y se redujo al 7% en quienes el *stripping* se realizó hasta la rodilla (Holme *et al.*, 1990).

Las nuevas técnicas de ablación endovascular, asociadas a una menor convalecencia y dolor postoperatorios al eliminar la disección inguinal, permitirían anticipar una menor incidencia de neovascularización y una menor tasa de recurrencias. Además, al mantenerse las tributarias colaterales

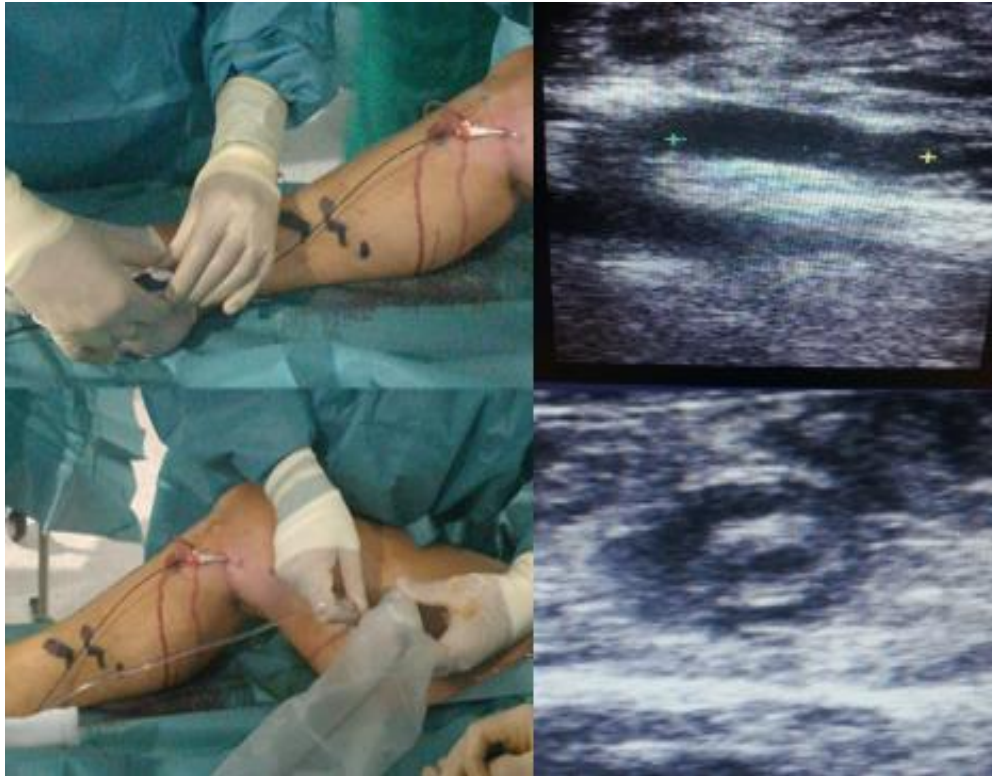


del cayado permeables se eliminaría la hipertensión venosa local al mejorarse su drenaje localmente y así se reduciría la neovascularización (Chandler *et al.*, 2000).

La comparación de la cirugía convencional con las nuevas alternativas endovasculares, EVLA y RFA, supone confrontarla a procedimientos en desarrollo, Se han comunicado una menor recurrencia por neovascularization al comparar EVLA con el stripping del 1% frente al 18% (Theivacumar *et al.*, 2009) y menos dolor postoperatorio en especial en la RFA (Sheperd *et al.*, 2010), con un menor tiempo de recuperación. Por el contrario, el ensayo RELACS que compara EVLA y el stripping considera que ambos son equivalentes en seguridad y eficacia a medio plazo, pero con una superioridad a largo plazo de la cirugía convencional en términos de recurrencia local (Murad *et al.*, 2011; Rass *et al.*, 2015; O'Donnell TF *et al.*, 2016). Tales diferencias subrayan la necesidad de disponer de una mejor evidencia en el tratamiento endovenoso donde la incorporación progresiva de modificaciones técnicas en una técnica en desarrollo, puede contribuir a modificar la validez de sus datos.



**Figura 8.** Fuente de radiofrecuencia RFA y catéter centimetrado.



**Figura 9.** Imágenes de RFA con catéter. (CAUSA).

Respecto a la escleroterapia con polidocanol en 2004 se publicó una Revisión Sistemática Cochrane (Rigbi *et al.*, 2004) en la que se informaba de una tendencia hacia unos resultados precoces en favor de la escleroterapia, pero tras un periodo de dos a tres años de seguimiento esa tendencia se revertía en favor de la cirugía. Comparar estas dos técnicas en cualquier caso no es sencillo pues la cirugía persigue resolver el problema de la IVC en su único acto quirúrgico, mientras que la escleroterapia exige múltiples sesiones. Además, no se puede soslayar que en los resultados de la escleroterapia hay gran variabilidad, pues la técnica exige gran habilidad y experiencia y el procedimiento esclerosante puede ser practicado de forma insuficiente, o la compresión postprocedimiento ser inadecuada, carencias atribuibles a una falta de entrenamiento adecuado (Guess *et al.*, 2000).

Alternativamente se ha planteado la cirugía conservadora con preservación de la safena interna mediante estrategia CHIVA. Realizada con anestesia local y ecoguiada, se basa en la interrupción del punto donde se localiza el reflujo venoso, sin eliminar toda la safena interna y plantea que los segmentos adecuadamente drenados prevendrán una futura recidiva ante una mejora hemodinámica

postoperatoria del sistema venoso superficial (Carandina *et al.*, 2008). Como ventajas presenta una reducción del tiempo de recuperación con menores complicaciones postoperatorias y menor neovascularización al no realizarse *stripping*, pudiendo utilizarse la safena interna para futuras revascularizaciones de pacientes coronarios o en pacientes con isquemia crítica de miembros inferiores. Por el contrario, esta técnica requiere un exhaustivo conocimiento de la técnica para obtener buenos resultados (Milone *et al.*, 2011), y tiene reducida aceptación a nivel mundial con escasas publicaciones en literatura anglosajona, lo que limita su generalización. Las guías de la Society of Vascular Surgery SVS sólo la recomiendan en casos seleccionados por cirujanos experimentados. Se necesitan un mayor número de estudios para confirmar los resultados publicados.

### 1.3 ESTADO ACTUAL A NIVEL BIOMOLECULAR

El Capítulo Español de Flebología y Linfología de la Sociedad Española de Angiología y Cirugía Vascular, por medio de su Comité Científico, publicó en 2015 la Guía de Práctica Clínica en Enfermedad Venosa Crónica. Esta guía es una adaptación a nuestro medio de la actual evidencia recogida en las guías internacionales (Nicolaidis *et al.*, 2014) posteriormente reactualizadas (Nicolaidis *et al.*, 2018, 2020) en epidemiología, clasificación, diagnóstico, calidad de vida, tratamiento conservador y farmacológico, técnicas quirúrgicas y endoluminales, prevención de recurrencias, tratamiento del síndrome posttrombótico y se completa con una exposición de las cuestiones aún por resolver en el futuro. En el apartado de Fisiopatología, se comunica que “Las varices son la manifestación más común de la IVC y se cree que son debidas a una alteración de la distensibilidad del tejido conectivo de la pared venosa”. En el subapartado correspondiente a cambios en la microcirculación por la hipertensión venosa, se resumen en un único párrafo los aspectos genéticos y biomoleculares.

El progreso del conocimiento de la IVC ha permitido detallar la anatomía y la fisiopatología venosas del reflujo y la incompetencia valvular causantes de la dilatación venosa, y aunque se han superado obstáculos importantes los interrogantes permanecen, recurriendo a su diagnóstico como varices esenciales. ¿Pero cómo se gesta la incompetencia valvular? ¿Hay alteraciones estructurales en la pared de la vena donde se localizan las válvulas y el reflujo es una consecuencia de ello?



La singularidad de nuestra bipedestación supone que la IVC no afecte a otros mamíferos, careciendo por ello de un modelo animal fiable. En bipedestación la columna de sangre transmite a la pared de la vena en el tobillo una presión hidrostática de aproximadamente 90-100 mmHg desde los 10-15 mmHg registrados en decúbito. Igualmente, las cifras de presión se reducen hasta unos 20-30 mmHg durante la deambulación. Porqué la presión hidrostática en ciertos pacientes ocasiona la aparición de varices permanece siendo una incógnita y pese a que ha habido progresos en investigación básica, éstos no han avanzado al mismo ritmo que en otras enfermedades vasculares. Por todo ello los mecanismos específicos biomoleculares o genéticos de su etiopatogenia no han sido totalmente esclarecidos y muchos interrogantes permanecen sin resolver a pesar de su prevalencia.

#### **1.4 ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DE LA PARED VENOSA**

La red venosa transporta la sangre desoxigenada desde la periferia hasta el corazón. En los miembros, el sistema superficial de la circulación cutánea drena al sistema venoso profundo que drena los músculos y ambos se comunican mediante perforantes que atraviesan las fascias. El 85% del retorno se hace a través del sistema venoso profundo y el 15% a través del sistema venoso superficial.

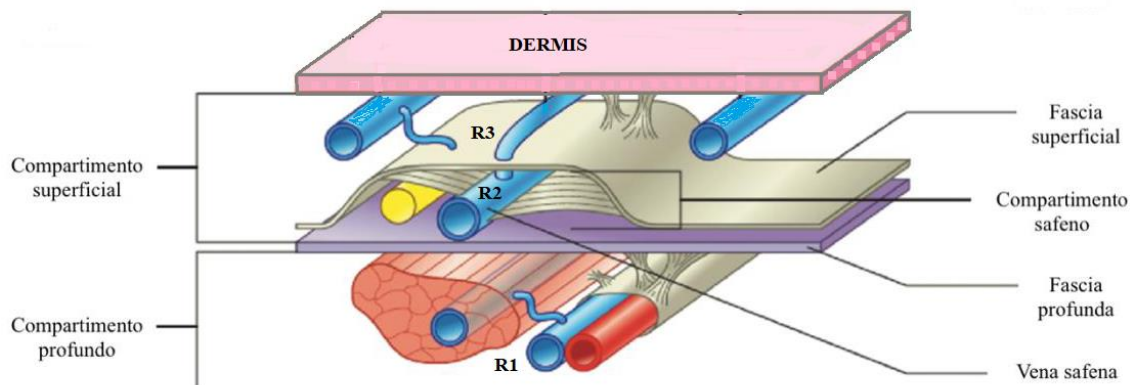
En la extremidad inferior, existen dos fascias, una fascia profunda, que recubre los planos musculares, y otra superficial que delimita el tejido celular subcutáneo. En las algunas zonas, las fascias se hallan juntas y en otras, presentan un desdoblamiento entre ellas creándose el subcompartimiento para la vena safena interna o mayor y la safena externa o menor. En función a su relación a esas fascias, utilizamos una nomenclatura para describir las redes venosas de utilidad para hacer una cartografía de la anatomía y hemodinámca venosas de la extremidad inferior:

Red primaria o R1: venas que se encuentran en un plano profundo a la fascia profunda, correspondientes al sistema venoso profundo.

Red secundaria o R2: venas que se encuentran situadas en el interior de la fascia de desdoblamiento, y se corresponden con la vena safena interna (VSI), vena safena anterior o accesoria (VSA), vena de Giacomini y vena safena externa (VSE).

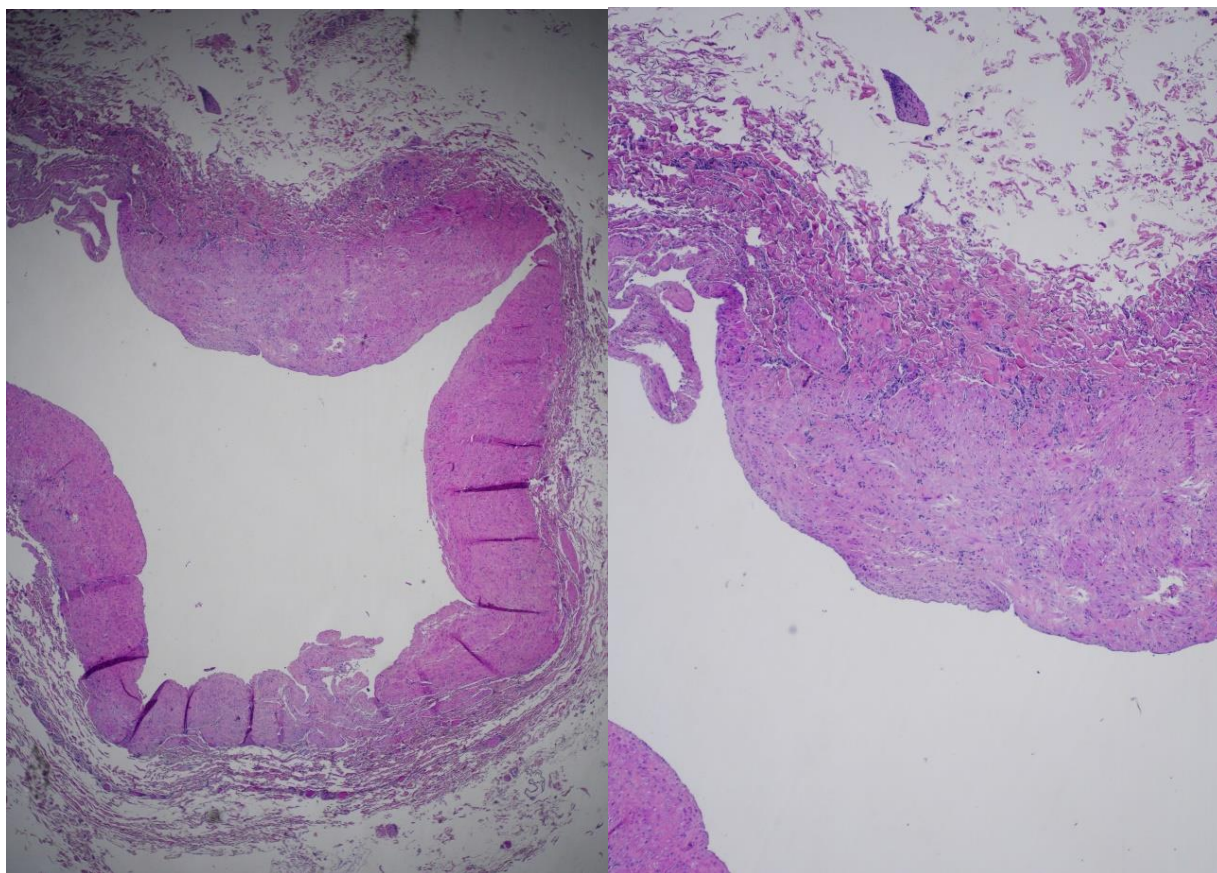
Red terciaria o R3: son aquellas venas que atraviesan la fascia superficial, localizándose por fuera de la fascia de desdoblamiento y se originan en venas perforantes refluyentes de la Red secundaria (venas safenas y Giacomini).

Red cuaternaria o R4: son aquellas venas que conectarían a dos segmentos de safena entre sí, o sea, es un R3 que conecta dos R2, en la misma red secundaria en dos puntos distintos, llamándose R4 longitudinal, o en dos redes secundarias distintas.



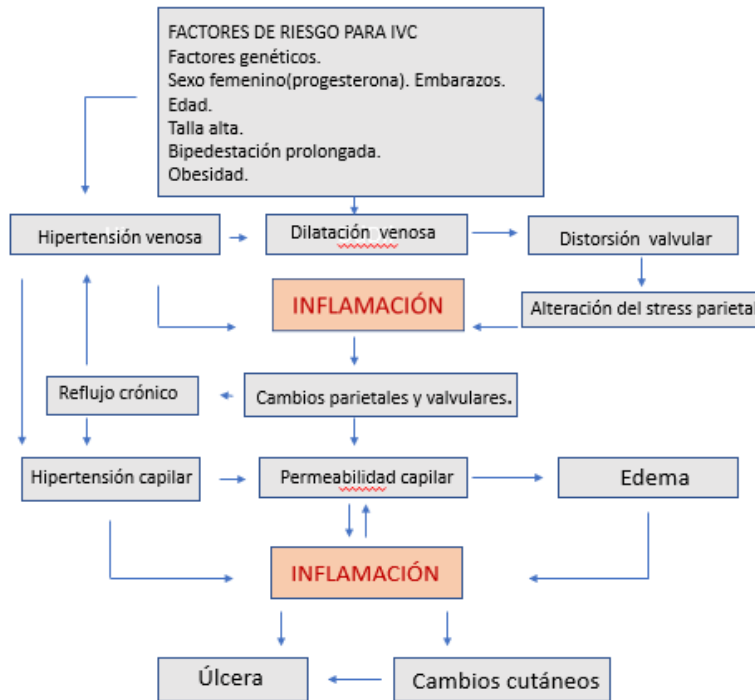
**Figura 10.** Modificado de Caggiati A., Bergan J., Gloviczki P., Jantet G., Wendell- Smith C., Partsch H. Nomenclatura venosa consensuada. *J Vasc Surg* 2002.

Histológicamente la pared venosa presenta tres capas cuyos límites están menos diferenciados que en las arterias. La íntima está compuesta por una monocapa de células endoteliales cuboidales con uniones interendoteliales poco desarrolladas que incrementan su permeabilidad, y una delgada membrana basal. La media consiste en células musculares lisas dispuestas circunferencialmente, rodeadas por una matriz extracelular en la que el colágeno tipo I es el componente dominante. A diferencia de las arterias, ricas en elastina y sometidas a importantes variaciones de la presión arterial, las venas se exponen a escasas variaciones en la presión y su contenido de elastina es escaso. La adventicia suele ser más gruesa. Es una red de matriz extracelular dominada por colágeno (que puede continuarse con el colágeno del tejido conectivo de soporte circundante) fibroblastos y escasos vasa vasorum.

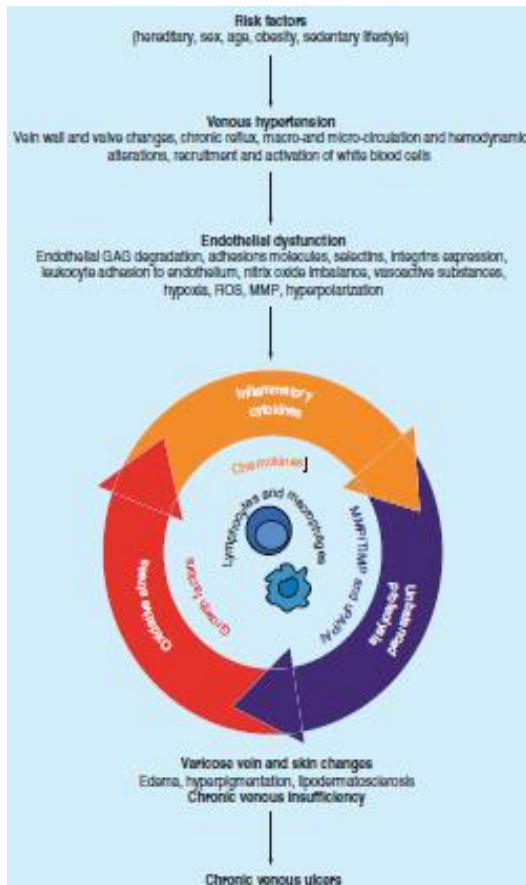


**Figura 11.** Corte de vena safena interna varicosa. Hematoxilina-eosina x2 y x4 aumentos. D<sup>a</sup> M. Sancho. (CAUSA).

## 1.5 ETIOPATOGENIA DE LA IVC VARICOSA



**Figura 12.** Factores etiopatogénicos e inflamación como protagonista de la IVC.



**Figura 13.** Los cambios hemodinámicos producen la activación endotelial y la expresión de factores de crecimiento y moléculas de adhesión y señalización facilitando la activación de leucocitos y monocitos que determinan la disfunción endotelial. Modificado de Mannello *et al.*, 2014.

La enfermedad varicosa es de carácter multifactorial. Predisponen a su desarrollo tanto factores ambientales como la bipedestación y sedestación prolongadas vinculadas muchas veces a actividades laborales concretas, como factores genéticos siendo más prevalente en el sexo femenino, de forma especial en multíparas y factores constitucionales como el sobrepeso y la talla alta o la edad. A lo largo del tiempo la investigación básica orientada a su patogenia ha evolucionado enfocándose a diversos aspectos relacionados con el stress hemodinámico y alteraciones parietales y/o biomoleculares.

En 1917, J. Homans planteó que “el sobreestiramiento de las paredes venosas y la destrucción valvular, producen un estasis que interfiere con la nutrición de la piel y los tejidos subcutáneos”. Esto inspiró la línea de investigación que correlaciona hipoxia, estasis e IVC. Fue A. Blalock en 1929 quien primero analizó esta correlación y planteó que la hipoxia local precipita la IVC.

Browse y Burnand propusieron la hipoxia tisular local y las alteraciones en el flujo sanguíneo de nutrientes como la etiología subyacente (Browse y Burnand, 1982). Su estudio demostró el efecto de la hipertensión venosa en la microcirculación venosa, observando a microscopía el depósito de “manguitos de fibrina” pericapilares. Igualmente, Coleridge-Smith propuso que el atrapamiento de leucocitos en segmentos venosos distendidos de flujo lento produce hipoxia (Coleridge-Smith et al., 1988). Su posterior activación y degranulación de metabolitos tóxicos es responsable de la lesión endotelial decisiva en el desarrollo de IVC. Burnand también planteó una correlación entre la incapacidad de la bomba gemelar para reducir la presión venosa del pie en el ejercicio y el número de capilares en la piel (Burnand et al., 1981).

En el año 2006 Bergan publicó una revisión sobre los mecanismos de la IVC y puso el foco sobre la inflamación y sus mediadores como el mecanismo patogénico de la IVC para lo que realizó estudios experimentales con modelos de hipertensión venosa en animales (Bergan et al., 2008).

TEORIAS ETIOPATOGENICAS DE LA IVC		
J. Homans	1917	Sobreestiramiento parietal y destrucción valvular.
A. Blalock	1929	Hipoxia y estásis.
N.Browse y K.Burnand	1982	Manguitos de fibrina pericapilares.
S.Takase	2000	Shear stress o tensión parietal.
J.Bergan	2006	Inflamación.
J.Birdina	2017	Hipoxia, inflamación y remodelamiento parietales.

**Figura 14.** Teorías etiopatogénicas de la IVC. Modificado de Bergan JJ *et al.*, 2006.

### 1.5.1 TEORIAS HEMODINÁMICAS: EL PAPEL DE LA PRESIÓN VENOSA Y DEL SHEAR STRESS

La presión venosa es determinada por la presión residual que pasa de las arterias a las venas tras el amortiguamiento del lecho capilar y esencialmente por la bomba muscular gemelar y plantar. Adicionalmente, la contracción cardíaca y la inspiración crean una diferencia de presión que favorece la aspiración hacia las cavidades cardíacas. La competencia valvular es la variable restante de una correcta fisiología venosa.

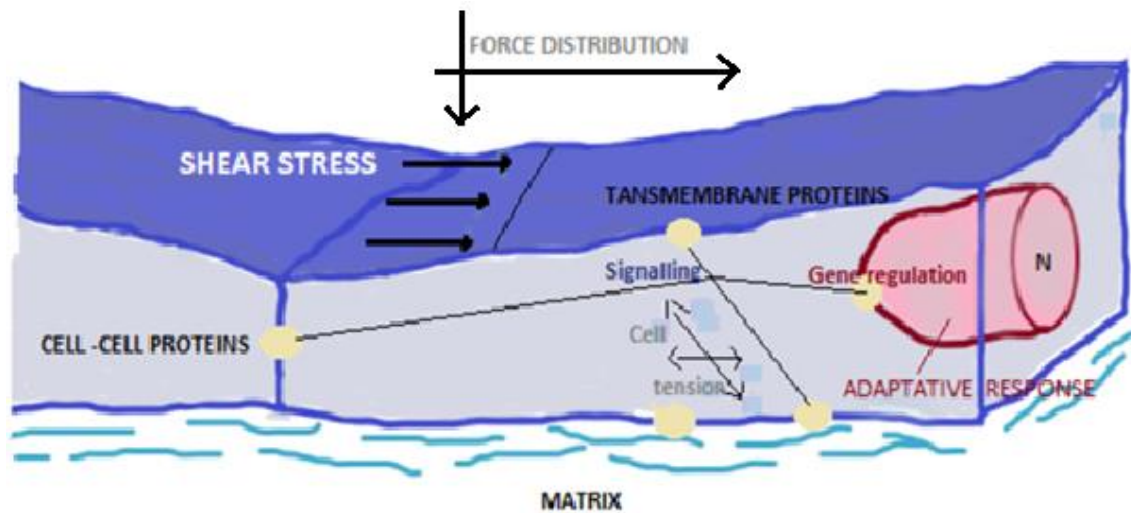
Las válvulas venosas pueden tolerar presiones venosas altas por periodos limitados de tiempo. Si estas condiciones se prolongan, se produce inflamación local con infiltración de granulocitos y de células del sistema monocito macrófago, y elevación de las metalo proteinasas de la matriz 2 y 9 o MMP (en inglés *matriz metalloproteinase*) y remodelación valvular (Takase *et al.*, 2000).

Las paredes de los vasos se encuentran bajo un stress mecánico constante debido a fuerzas circunferenciales o radiales, y a fuerzas longitudinales o friccionales en paralelo a la pared del vaso y que se pueden traducir como tensión tangencial o de deslizamiento (en inglés *endothelial shear stress*) sobre el endotelio



Los cambios en el entorno hemodinámico presentan una regulación exquisita, desencadenándose respuestas biológicas y bioquímicas que persiguen restaurar los niveles basales de tensión y shear stress actuando como moduladores de la síntesis de proteínas y de la migración, diferenciación y proliferación celulares.

Los cambios agudos en tales fuerzas mecánicas de estiramiento y shear stress inducen cambios transitorios, incluyendo la liberación de agentes vasoactivos y alteraciones en el diámetro del vaso. Los cambios crónicos exigen remodelación vascular y alteraciones adaptativas significativas en la forma y composición de la pared del vaso (Pohl *et al.*, 1986, Rubanyi *et al.*, 1986, Cheng *et al.*, 1996 y Lu *et al.*, 2011).



**Figura 15.** Fuerzas radiales y circunferenciales sobre la pared venosa.

Los cirujanos vasculares conocemos bien los efectos de los cambios parietales de las venas y su adaptabilidad a los cambios en la presión intraluminal. Son ejemplo de ello los cambios parietales cuando son utilizadas para revascularizaciones arteriales mediante *bypass* o en quienes se realizan fístulas arteriovenosas para hemodiálisis. No obstante, la teoría hemodinámica clásica no explica enteramente la patogénesis y se pueden observar varices bajo válvulas enteramente competentes (Labropoulos *et al.*, 1997).

### 1.5.2 TEORÍAS PARIETALES: CAMBIOS ESTRUCTURALES EN LA PARED VENOSA

Un importante avance se produjo con el hallazgo de infiltración de los velos valvulares y de la pared venosa por monocitos y macrófagos en las muestras de venas varicosas a diferencia de los pacientes del grupo control (Ono *et al.*, 1998). La infiltración se asoció con áreas de endotelio que expresaron moléculas de adhesión intercelulares (en inglés *Intercellular Adhesion Molecules* ICAM-1) (Takase *et al.*, 2000).

Aunque hay datos contradictorios relativos al contenido de colágeno en las paredes de las venas varicosas la mayoría de los estudios ha demostrado que está elevado en comparación a las sanas.

En cultivos de células de músculo liso procedentes de varices dependientes de venas safenas, se ha comunicado un desequilibrio entre el colágeno de tipo I que confiere rigidez, y el colágeno III que confiere elasticidad y distensibilidad, debilitándose por ello la pared de venas varicosas (Badier-Commander *et al.*, 2000, San Silvestri *et al.*, 2001 y Carlo-Toumaniantz *et al.*, 2007). La disminución relativa del colágeno tipo III respecto al colágeno tipo I se ha atribuido a un desequilibrio por sobreexpresión de los inhibidores tisulares o TIMP I de metaloproteinasas degradativas de la matriz tipo I o MMP I, produciéndose así un mayor ratio del fisiológico de TIMP I/MMP I y una elevación del colágeno tipo I.

Tales desequilibrios entre las MMP y sus inhibidores TIMP en las venas varicosas, respecto a las muestras de controles sanos podrían favorecer la acumulación de matriz extracelular en las venas varicosas. (Badier-Commander *et al.*, 2000) y tales cambios podrían contribuir a su debilidad y elasticidad reducidas alternándose regiones de atrofia en las que la matriz extracelular (MEC) y las células musculares lisas están reducidas, con regiones de hipertrofia parietal, con MEC aumentada e interrupción de la disposición ordenada de las células musculares lisas y de las fibras de elastina (Travers *et al.*, 1996, Wali *et al.*, 2002 y San Silvestri *et al.*, 2007).

La degradación de las proteínas de la matriz extracelular es causada por enzimas proteolíticas que incluyen las metaloproteinasas de la matriz (MMP) y las serin-proteasas, producidas por células vasculares e inflamatorias. Las MMP se liberan como proenzimas que son activadas por otras proteinasas, incluidas las producidas por mastocitos e inhibidas por los inhibidores tisulares de MMP o TIMP (Johnson *et al.*, 1998 y Jacob *et al.*, 2001).



Igualmente, los estudios que han cuantificado la elastina han confirmado una reducción inversamente proporcional al diámetro de la vena (Jeanneret *et al.*, 2007) y contrariamente una elevación de la laminina en la matriz extracelular (San Silvestri-Morel, 2007).

Adicionalmente elevados niveles de factor de crecimiento transformante y de factor de crecimiento de fibroblastos, TGF- $\beta$ 1 y FGF (en inglés *transforming growing factor  $\beta$ 1* y *Fibroblast Growth Factor* respectivamente), se han encontrado en la pared de las venas varicosas (Badier-Commander *et al.*, 2001). El TGF- $\beta$ 1 estimula el colágeno y la síntesis de elastina y aumenta la expresión de TIMPs, mientras que FGF es quimiotáctico y mitogénico para las células del músculo liso (Overall *et al.*, 1991). Todos estos cambios podrían explicar los cambios en las paredes varicosas y la alternancia de segmentos hipertróficos y atróficos.

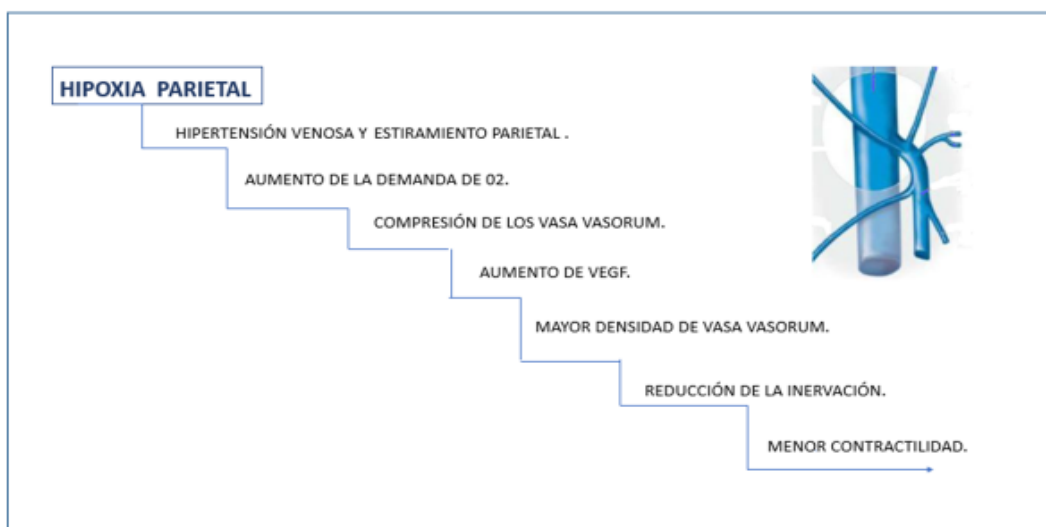
En 2017 se publicó una revisión de la literatura en inglés de la fisiopatología de las venas varicosas con treinta y tres referencias bibliográficas entre 1989 y 2016. El autor subraya el carácter multifactorial de su patogénesis, sin poder responder a la pregunta de cual es factor desencadenante, y se cuestiona si la alteración hemodinámica y valvular preceden a los cambios parietales o viceversa (Jacobs *et al.*, 2017).

En el mismo año, otro estudio histoquímico describía la disrupción de la arquitectura parietal resumiendo una importante cascada de fenómenos patogénicos involucrados en el origen de las varices. En su modelo fisiopatológico se agrupaban tres mecanismos: la hipoxia de la pared venosa, la inflamación y el remodelamiento de la misma, involucrando moléculas de adhesión (ICAM 1, VCAM 1), VEGF, PGP 9.5 (en inglés *protein gen product 9.5*) y los principales componentes de la lámina basal como el colágeno IV, laminina y la fibronectina en la vena safena interna insuficiente (Birdina *et al.*, 2017).

La hipoxia de la pared se ha propuesto como factor causal de la formación de varices (Lim *et al.*, 2011 y Atta, 2012). El oxígeno y los nutrientes difunden desde la luz al endotelio y al tercio interno de la capa media. Los *vasa vasorum* son los responsables de los dos tercios restantes de la media. La hipertensión venosa produce un estiramiento de la pared, que aumenta su demanda de oxígeno y simultáneamente una compresión de los *vasa vasorum*, que acentúa así la hipoxia. A su vez, la hipoxia produce una relajación de la pared que aumenta la ectasia y la hipertensión venosa, y así sucesivamente en un bucle de autoperpetuación de hipoxia de la pared-insuficiencia venosa. En respuesta a ese *feed back* se confirmó que el número de *vasa vasorum* se incrementaba en la adventicia y en la media de

las venas varicosas en comparación con las venas normales, hallazgo ya comunicado anteriormente en el análisis histológico de la pared varicosa (Atta, 2012 y Tonar *et al.*, 2012). En este aumento de la actividad angiogénica local, el VEGF actúa en respuesta a la hipoxia como un regulador y promotor de la aparición de tales neo-*vasa vasorum*, con un importante papel en la inducción y crecimiento de las células endoteliales (Inoue *et al.*, 1998). Su elevación se ha confirmado en la pared de las venas varicosas en comparación con las sanas (Rework *et al.*, 2007; Kowalewski *et al.*, 2011) y análogamente también se ha comunicado un incremento en el plasma (Atta, 2012).

Adicionalmente el VEGF tiene propiedades proinflamatorias, aumentado la permeabilidad a macromoléculas (Ferrara *et al.*, 2003) y también posee propiedades neurotróficas y neuroprotectoras habiéndose establecido una correlación positiva con PGP 9.5, una proteína citoplasmática de células neuronales y neuroendocrinas. La disminución significativa de PGP 9.5 en las venas varicosas concuerda con la reducción en la inervación de su pared (Van Rij *et al.*, 2004 y Loesch *et al.*, 2009) y supondría una disminución de la contractilidad de las células musculares lisas, la distensión progresiva y el incremento del reflujo correspondientes (Pocock *et al.*, 2014).

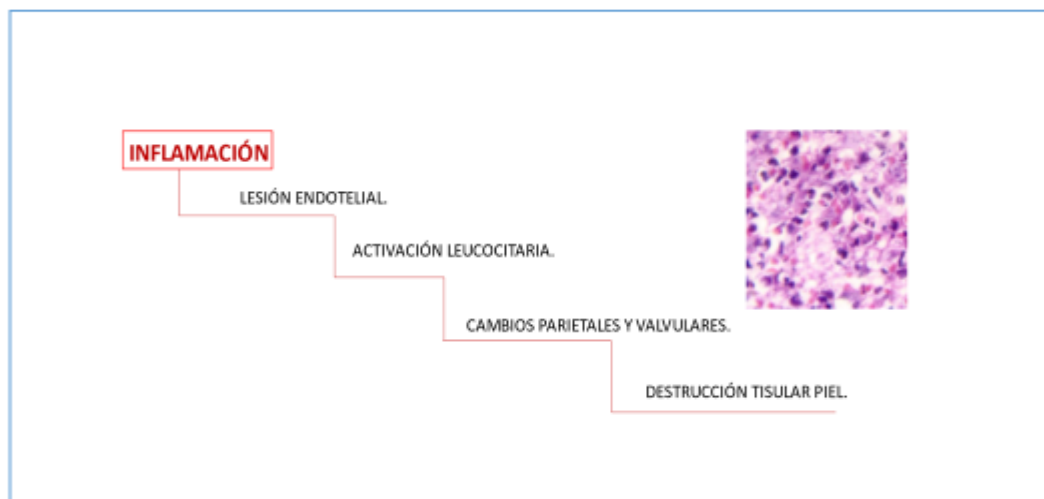


**Figura 16.** Cascada Hipóxica en la fisiopatología de las varices esenciales.

La distensión y estiramiento parietales, la elevación de la presión venosa por el reflujo y la rigidez de la matriz extracelular pueden lesionar el endotelio expresándose mediadores inflamatorios de activación leucocitaria, y factores de crecimiento como el ICAM-1 (en inglés *Intercellular Adhesión Molecule 1*) o el VCAM-1(en inglés *Vascular Adhesión Celular Molecule 1*). Tras la adhesión endotelial leucocitaria, su posterior migración es facilitada por el VEGF (Takase *et al.*, 2000). Los

leucocitos activados liberan enzimas proteolíticas, radicales libres y citocinas que contribuyen tanto en los cambios parietales y valvulares, como en la destrucción tisular y de la piel (Ojdana *et al.*, 2009).

Aportaciones españolas confirman un incremento en el número de mastocitos y del TGF- $\beta$  (Pascual *et al.*, 2007), un incremento significativo de Interleukina 8 y MCP-1 o proteína quimio atrayente de los monocitos (en inglés *monocyte chemoattractant protein 1*), (Del Río *et al.*, 2009) y la expresión del VEGF bajo condiciones de hipoxia (Ortega *et al.*, 2018).



**Figura 17.** Cascada inflamatoria en la fisiopatología de las varices esenciales.

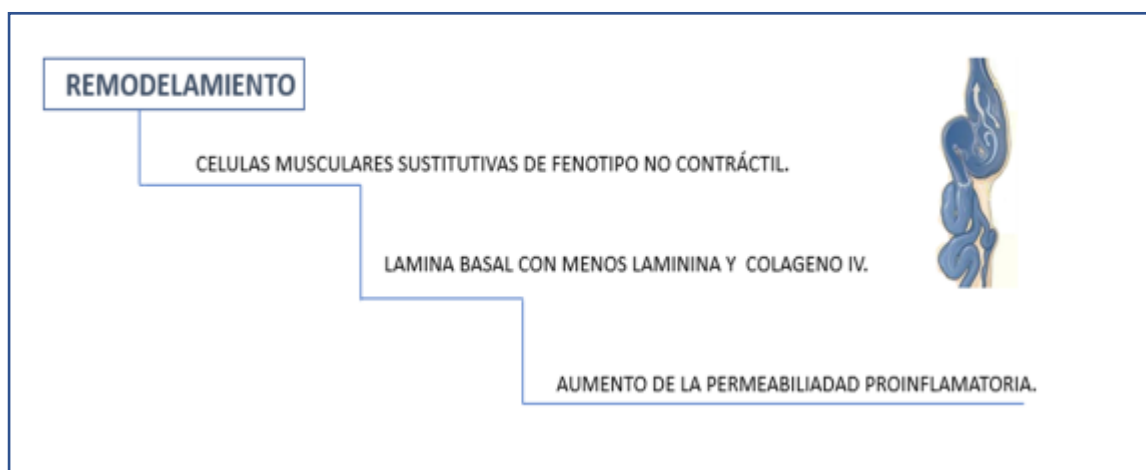
En este entorno inflamatorio, las citocinas sintetizadas por macrófagos, fibroblastos y células de la pared venosa inhiben la expresión de MMP. El TGF  $\beta$  inhibe la síntesis de colagenasa y aumenta la expresión de TIMP, particularmente en los segmentos varicosos más tortuosos que alternan regiones de hipertrofia con regiones de atrofia parietales en las que el contenido de colágeno y elastina están alterados. Las zonas atróficas tienen menos MEC y células musculares lisas, mientras que las zonas hipertróficas tienen mayor cantidad de MEC y disrupción de las células musculares lisas (Pocock *et al.*, 2014).

En las venas sanas la media o capa muscular se compone de células musculares lisas de fenotipo contráctil y aspecto fusiforme. Sin embargo, en las venas varicosas las células musculares son elípticas y con numerosas vacuolas ricas en colágeno presentando la estructura de la pared áreas de desorganización celular (Naim *et al.*, 2005).

Escasas comunicaciones han descrito el papel de la membrana basal en la patogénesis de las varices (Bradshaw *et al.*, 2016). La lámina basal es una estructura reticular compuesta de fibronectina,

colágeno tipo IV y laminina principalmente. La fibronectina es una glicoproteína que interactúa con el colágeno conectando la lámina basal con el tejido circundante y además participa en la agregación durante la hemostasia, la fibrinólisis y la cicatrización; la laminina es una glicoproteína con función de anclaje endotelial. En el estudio de Birdina con inmunomarcaje de la lámina basal se demostró una reducción en los depósitos de laminina y de colágeno tipo IV en el grupo de venas varicosas frente al de sanos que también contribuirían a incrementar la permeabilidad microvascular y la extravasación celular proinflamatorias que alteran la integridad parietal.

La fibronectina también tiene propiedades leucoquimiotácticas y de estímulo para la adhesión para monocitos y linfocitos, involucrándose en la actividad fagocítica de los macrófagos sobre células dañadas. El daño endotelial incrementa la expresión y la formación de depósitos subendoteliales de fibronectina como respuesta reparativa en el remodelamiento para mantener la integridad parietal (San Silvestri- Morell *et al.*, 2007).



**Figura 18.** Remodelamiento en la Fisiopatología de las varices esenciales.

Todos estos cambios biomoleculares se engloban en el concepto de la disfunción endotelial, en un escenario que combina stress oxidativo y reducción del óxido nítrico, con aumento de la permeabilidad vascular y un status proinflamatorio favorecedor de la adhesión leucocitaria y de fenómenos angiogénicos. El estudio de la disfunción endotelial ha sido tradicionalmente más extensamente focalizado en la enfermedad arteriosclerosa y cardiovascular (Boulanger, 2016) y en la pandemia COVID-19 ha pasado al primer plano de la actualidad al haberse ido esclareciendo su fisiopatología desde su debut como una infección respiratoria hacia una infección endotelial sistémica (Montiel *et al* 2022).

### 1.5.3 ASPECTOS GENÉTICOS.

La herencia genética y epigenética son otros factores fuertemente involucrados. La heterogeneidad en la literatura y los resultados de los estudios indican probablemente distintos tipos de predisposición genética. Diferentes genotipos para un mismo fenotipo, con distintos patrones de herencia en cada caso.

Se han descrito familias con un patrón autosómico dominante de penetrancia incompleta, asociado al gen *FOXC2* en el cromosoma 16q24. Las proteínas FOX (en inglés *Forkhead box*) son una familia de factores de transcripción que regulan la expresión de genes involucrados en la proliferación, diferenciación y longevidad, de importancia en el desarrollo embrionario. Su mutación heterocigota se ha involucrado en la disfunción valvular del sistema venoso superficial y profundo (Mellor *et al.*, 2007 y Serra *et al.*, 2012).

Progresivos estudios de ligamiento genético presentan nuevos locus como el *COL1A2* (colágeno tipo 1) susceptibles de relacionarse con la aparición de varices (Jin *et al.*, 2013).

Respecto a la expresión del VEGF endotelial y epidérmico se ha comunicado una sobreexpresión de sus genes en los pacientes con varices (Florez *et al.*, 2013). Todos estos datos corroboran la importancia de los factores genéticos y el cambio de secuencia en algunos alelos de genes relacionados con el metabolismo de la pared que podrían determinar la herencia de la enfermedad varicosa, su recurrencia o su forma de presentación. Desde el punto de vista epidemiológico, en la práctica clínica se puede anticipar que si los dos progenitores tienen varices el riesgo de que los hijos las desarrollen puede elevarse hasta el 90% (Cornu-Thenard *et al.*, 1994).

#### 1.5.4 SENESCENCIA ENDOTELIAL

De manera especial en las dos pasadas décadas, el envejecimiento se ha asociado con la disfunción endotelial. Tales hallazgos se han descrito más extensamente en pacientes con enfermedad cardiovascular arterial, acumulándose evidencias de cómo la senescencia de las células endoteliales, las células musculares y los fibroblastos contribuyen al desarrollo de la arterioclerosis (Park y Park, 2015). El envejecimiento también se asocia a una reducción de la eNOS y por consiguiente del NO y de su acción vasodilatadora (North y Sinclair 2012), y a una acumulación de colágeno y pérdida de miocitos (Fujimoto et al, 2012).

Por el contrario, los estudios que estudian la senescencia en venas son escasos pues el manejo de la IVC en edades avanzadas suele ser preferentemente conservador. Se ha observado como el suero de los pacientes aquejados de varices puede inducir la senescencia en las células endoteliales HUVEC (en inglés *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) lo que se ha correlacionado con la presencia de factores proinflamatorios mediados por TGF- $\beta$  en el suero de estos pacientes (Mikula-Pietrasik *et al.*, 2016).

En la misma dirección se ha investigado el papel de proteínas reguladoras del ciclo celular p53/p21 y p16 con función inhibidora de la proliferación celular al actuar deteniendo la fase G1. Se han descrito niveles elevados en adultos sedentarios como marcadores de disfunción endotelial y de riesgo vascular (Rossman *et al.*, 2017). Se ha intentado establecer una correlación entre la sobreexpresión de las mismas proteínas de ciclo celular en la unión safenofemoral de las venas varicosas respecto a las sanas encontrando sobreexpresión de p53 en la unión safenofemoral insuficiente y de p16 en el grupo analizado de varices recidivadas (Mühlberger *et al.*, 2021).

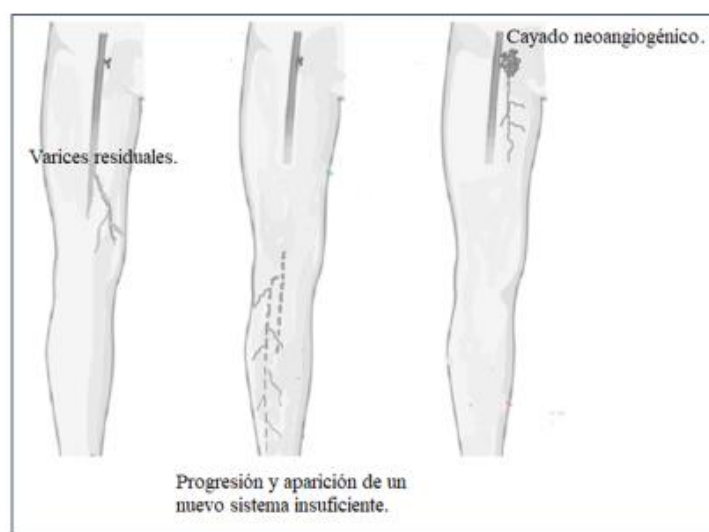
## 1.6 RECIDIVA VARICOSA

En la epidemiología de las varices recurrentes o recidiva tras la cirugía de varices se han comunicado prevalencias del 13 al 65% de los casos intervenidos (Brake *et al.*, 2013). Entorno a un cuarto de los pacientes que acuden consulta de patología venosa lo hacen por recidivas varicosas (Kostas *et al.*, 2004) y hasta un 20% de las intervenciones por varices se indican por recidivas (Van Rij *et al.*, 2014).

Desde que se definiesen los principios para su tratamiento quirúrgico (interrupción del flujo desde el sistema venoso profundo al superficial) y pese a los muchos avances diagnósticos (esencialmente la sistematización de la exploración con ecodoppler), y terapéuticos (CHIVA, escleroterapia, técnicas endovasculares etc.), la recurrencia persiste como uno de los problemas sin resolver. La recidiva además frecuente, plantea un tratamiento de una mayor dificultad técnica, con intervenciones quirúrgicas más prolongadas, y resultados asociados a una menor satisfacción en los pacientes que en la cirugía primaria.

Los estudios sobre este problema en muchos casos han sido retrospectivos y carentes de evaluación preoperatoria con ecodoppler. Además, las definiciones y clasificaciones de las recidivas, y los métodos y periodos de duración en los seguimientos han sido igualmente muy variables.

En el consenso de 1998 en Paris se propusieron líneas guía para la definición y descripción de la recidiva de las venas varicosas (Perrin *et al.*, 2000 y 2006).

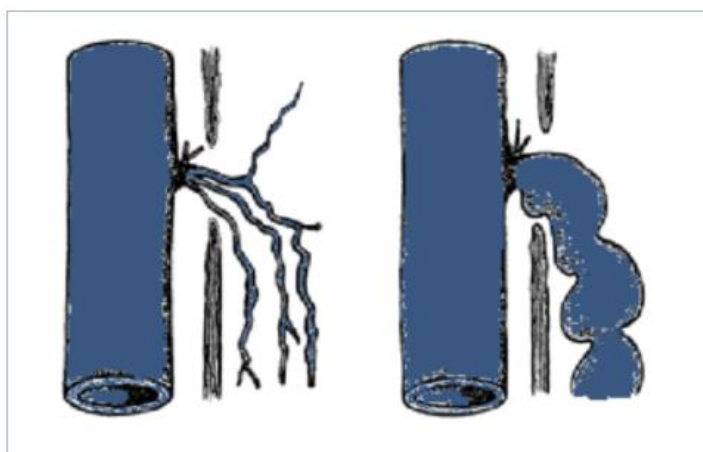


**Figura 19.** Tipos de varices recidivadas.

Se han definido tres tipos de venas varicosas recurrentes. (Perrin *et al.*, 2006) En primer lugar, venas varicosas residuales que no fueron debidamente tratadas en la intervención inicial. Se evidencian en el seguimiento precoz y son atribuibles a errores técnicos o de táctica terapéutica. En segundo lugar, verdaderas venas varicosas recidivadas que no eran evidentes precozmente y se presentan en el seguimiento en el territorio tratado anteriormente. Igualmente, pueden deberse a errores técnicos o tácticos, o a la neovascularización. En último lugar, nuevas venas varicosas que se presentan en áreas que inicialmente no fueron tratadas y se desarrollan por progresión de la enfermedad varicosa (Brake *et al.*, 2013).

La recurrencia clínica ha sido estudiada en el seguimiento mediante estudios prospectivos con ecodoppler. Realizar un ecodoppler al año de la intervención para detectar recurrencias incluso antes de que aparezcan clínicamente, puede ayudar a definir la probable etiología de la recidiva futura, concluyendo que si al año no se evidencia reflujo inguinal postoperatorio, lo más probable es que no haya recidiva por neovasvularización en el cayado en los años siguientes (Van Rij *et al.*, 2008).

En un intento de sistematizar los hallazgos de la recidiva inguinal Fischer ha clasificado los patrones ecográficos en dos tipos. El patrón más frecuente, tipo I, es el de venas tributarias serpenteantes desde la unión safenofemoral ligada de menos de 3mm y con un reflujo leve, limitadas a la ingle y sin conectar con varices superficiales en el muslo. No suelen asociar clínica importante y por ello no requieren reintervención. El tipo II con vasos de más de 3 mm de diámetro, en “racimo de uvas”, y que conectan con varices en el muslo, habitualmente un remanente de safena interna o de safena anterior, y con un reflujo de mayor cuantía, que si la requieren (Fischer *et al.*, 2002). Pese a este intento de sistematización la discriminación por ecodoppler es limitada pudiendo sobrestimarse el número de las conexiones y el reflujo proceder desde la vena epigástrica o la vena pudenda .



**Figura 20.** Clasificación de Fischer de recidiva inguinal.



En ocasiones el origen de las recurrencias se explica por una comprensión insuficiente de la anatomía y hemodinámica venosas. Una evaluación preoperatoria deficiente es el motivo de que se planifique una estrategia quirúrgica inadecuada. Por otro lado, pueden desarrollarse nuevos puntos de reflujo venoso, por el progreso de la enfermedad o como consecuencia de la neovascularización (Jones *et al.*, 1996; Nyameke *et al.*, 1998). La neovascularización y la progresión de la enfermedad varicosa han sido comunicadas como las causas más frecuentes de recurrencias en numerosos estudios (Van Rij *et al.*, 2003; Kostas *et al.*, 2004; Winterborn *et al.*, 2004; Allegra *et al.*, 2007).

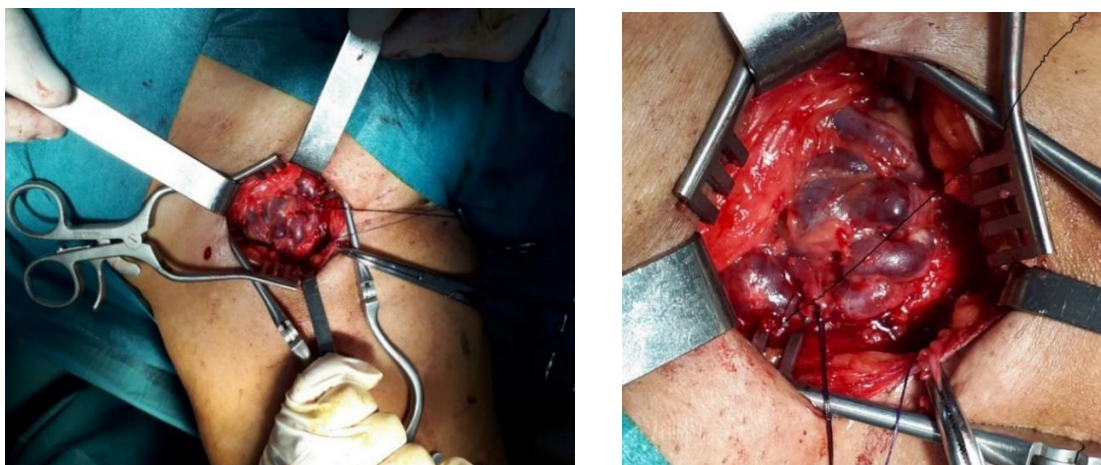
Un estudio preoperatorio exhaustivo, y una táctica y técnica correctas conseguirán reducir las varices residuales, pero no evitará las recurrencias debidas a la progresión de la enfermedad por la aparición de un nuevo sistema, por ejemplo, una nueva insuficiencia de la safena externa en pacientes que anteriormente han sido tratados de la safena interna y que se ha comunicado entorno a un 20-25% de las recurrencias (Darke *et al.*, 1992). Por último, en las recurrencias debidas a la neovascularización localizada en los trayectos de las venas anteriormente resecaadas o ligadas, los neovasos se forman desde la vena femoral común, el muñón safeno residual o sus colaterales, reconectando con venas incompetentes del sistema venoso superficial (De Maesneer *et al.*, 2004 y Labropoulos *et al.*, 2006). Se han comunicado incidencias muy variables que oscilan desde el 8 al 60% de las varices recidivadas (Egan *et al.*, 2006). La neovascularización y la progresión de la enfermedad varicosa han sido descritas como las causas más frecuentes de recurrencias en numerosos estudios (Van Rij *et al.*, 2003; Kostas *et al.*, 2004; Winterborn *et al.*, 2004; Allegra *et al.*, 2007).

La neovascularización se ha relacionado más frecuentemente tras la cirugía abierta tradicional, contribuyendo hasta un 18% de las recidivas y se la ha relacionado con el hematoma postoperatorio y el esparcimiento o *spillage* de células endoteliales durante el procedimiento intraoperatorio (Lurie *et al.*, 2005; Kianifard *et al.*, 2006; Theivacumar *et al.*, 2009).

En la neoangiogénesis desde vasos preexistentes se involucran factores de crecimiento, metaloproteasas de la matriz y sus inhibidores, factores inducidos por la hipoxia, el VEGF, el factor de crecimiento fibroblástico y factores de crecimiento plaquetario (Van Rij *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2011). La hipoxia, el stress mecánico y/o la inflamación, estimulan la angiogénesis que puede ser simultáneamente, fisiológica y patológica. Los mecanismos fisiopatológicos se han planteado alternativamente como respuesta fisiológica a la desconexión venosa y a la alteración del entorno hemodinámico en un sistema de venas susceptibles, como secuencia del proceso cicatricial en un entorno de hipoxia que induce la activación de células las endoteliales y la liberación de factores

angiogénicos, y como un proceso de recanalización y reendotelización de los trayectos previamente ocupados por venas (Witmer *et al.*, 2001; Munasinghe *et al.*, 2007). Los mecanismos responsables permanecen sin aclarar del todo y a los factores angiogénicos liberados desde los tejidos circundantes han de añadirse factores como el tipo de sutura empleado en el muñón safeno interno, la exposición del endotelio en el muñón libre y el trauma operatorio (Chandler *et al.*, 2000; Frings *et al.*, 2001; Creton *et al.*, 2004).

Histológicamente los neovasos tienen un aspecto primitivo e inmaduro. La neoformación de sus paredes es incompleta. Son paredes más finas que las venas sanas y sin una definición clara de las tres capas, sin fibras elásticas, sin nervios intramurales, sin vasa vasorum y rodeados de tejido cicatricial (Nyamekye *et al.*, 1998; Geier *et al.* 2005). Sin embargo, pese a las evidencias aportadas, otros autores también han cuestionado estos planteamientos y argumentan que pueden representar una adaptación en respuesta a los cambios de las fuerzas hemodinámicas en canales venosos preexistentes (El Waieh *et al.*, 2004).



**Figura 21.** Fotografía intraoperatoria de un neocayado inguinal. Detalle del ovillo neoangiogénico. CAUSA.

Con el fin de prevenir la recurrencia neoangiogénica se han ideado diversas técnicas. Las técnicas de barrera están encaminadas a cubrir el muñón ligado con un parche sintético o mediante el cierre de la fascia cribiforme. La interposición protésica no se aplica en la práctica por el riesgo de complicaciones potencialmente graves como la infección o el tromboembolismo pulmonar. En el abordaje de la unión safenofemoral, puede que en un porcentaje de casos indeterminado el cierre se realice suturando exclusivamente el plano graso sin suturar el plano aponeurótico, por la falta de conciencia de este problema en los cirujanos que realizan la intervención (De Maeseneer *et al.*, 2007; Van Rij *et al.*, 2008).

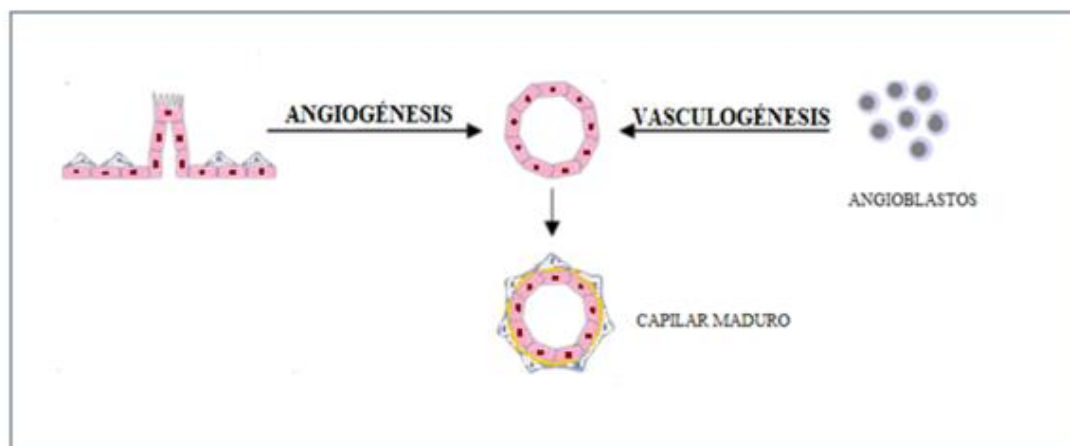
Otra técnica diferente es la inversión del endotelio del muñón con sutura de polipropileno en su borde, para impedir que su contacto con los tejidos de proximidad estimule la angiogénesis. En la Guía del American Venous Fórum, en las recomendaciones sobre el tratamiento quirúrgico de la incompetencia de la VSI se aconseja la ligadura alta de la unión safenofemoral (en inglés *flush ligation*) y el stripping de la VSI hasta la rodilla con una fuerza de recomendación 1A/B. Para otras actuaciones, como la exclusión del endotelio, la fuerza de recomendación es más débil (2C) (Howard *et al.*, 2009).

En las técnicas endoluminales al evitarse la crosssectomía, la cascada de fenómenos neoangiogénicos no es la misma; además se conserva el drenaje venoso de las venas pudendas y vena epigástrica superficial. El Registro Closure publicó en 2005 (Lune *et al.*, 2005) tasas de neovascularización inguinal menores al 1%.

Se requiere por todo ello una mejor comprensión de la biología molecular neoangiogénica de este problema para poder adoptar estrategias que pudiesen anticipar su aparición y así mejorar los resultados del tratamiento quirúrgico.

## 1.7 ANGIOGÉNESIS

La vascularización para la formación de un sistema circulatorio fisiológicamente maduro y funcional, depende de dos procesos diferentes: la vasculogénesis y la angiogénesis. La vasculogénesis es el proceso de formación de vasos durante las primeras etapas del desarrollo embrionario. Supone la diferenciación desde células precursoras endoteliales (en inglés *EPC*, *Endothelial Precursor Cells*) o angioblastos procedentes del mesodermo embrionario, el saco vitelino, el alantoides y la placenta, a células endoteliales. Esta agrupación celular forma una red en la que las células situadas en la periferia se denominan angioblastos y se diferenciarán en células endoteliales. Por su parte las células situadas en la parte central se diferenciarán en las células sanguíneas. La proliferación, migración y asociación de los angioblastos da lugar a unos vasos primitivos tubulares que después se desarrollarán dando lugar a la formación del lumen vascular y de la membrana basal formando la red vascular primitiva en la etapa embrionaria. Esa red se remodelará después vía angiogénesis en una más madura (Patel-Hett y D'Amore, 2011).



**Figura 22.** Esquema diferencial entre Angiogénesis y Vasculogénesis.

En la angiogénesis se forman neovasos desde las células endoteliales de redes vasculares preexistentes mediante el desarrollo de brotes o “*sprouting*”. Este proceso que interviene en la formación de la mayoría de los vasos embrionarios (Patel-Hett y D’Amore, 2011). En el adulto participa en la reparación de tejidos dañados, en la formación y crecimiento óseo, en el ciclo endometrial y en el desarrollo placentario. Igualmente es un mecanismo principal en la enfermedad tumoral, la retinopatía proliferativa o la isquemia crónica.

La vasculogénesis, angiogénesis, arteriogénesis, es decir el proceso de diferenciación de un capilar a arteria o vena, y el remodelado vascular de los vasos en función de las presiones y flujos recibidos posibilitan un sistema circulatorio que regula el aporte de nutrientes y la oxigenación, la eliminación de metabolitos, la respuesta inmunitaria, la homeotermia, y el mantenimiento de la presión arterial.

La angiogénesis es un complejo remodelado vascular constituido por una cascada integrada de sucesos, en el que las células presentan cambios morfogenéticos muy regulados y ha de existir un balance entre diferentes tipos celulares y entre factores proangiogénicos y antiangiogénicos.

Un desarrollo angiogénico cuantitativamente anómalo ocasiona por exceso hemangiomas, el sarcoma de Kaposi, la retinopatía del recién nacido prematuro, la endometriosis, o el crecimiento tumoral y las metástasis. Por defecto se produce el retardo de la cicatrización de las heridas, las úlceras o la isquemia miocárdica. Alternativamente, en una angiogénesis en la que el número de vasos parece normal, pero cuya estructura y composición celular no lo son, encontramos las malformaciones arteriovenosas (MAV), las telangiectasias o los neovasos tumorales, en los que la angiogénesis es excesiva pero cualitativamente deficiente. (Ollauri-Ibáñez *et al.*, 2017).

La angiogénesis se estudió por primera vez en 1939, al observarse una potente respuesta de formación de vasos implantando un tumor en la oreja de un conejo (Ide *et al.*, 1939). Hoy conocemos que es un proceso muy conservado en la evolución (Muñoz-Chápuli, 2011), que se desencadena principalmente en respuesta a hipoxia.

El principal estímulo en la inducción de la angiogénesis es la hipoxia. El oxígeno difunde a los tejidos proporcionalmente a su proximidad a los vasos. Si el suministro es menor que la demanda tisular, ya sea por alteración en su difusión, por sobrecrecimiento que supere el límite de difusión, o por un insuficiente aporte sanguíneo, se genera un foco hipóxico. En ese microambiente, las células acumulan factor inducible por hipoxia 1 o HIF-1, (en inglés *Hypoxia-Inducible Factor 1*) que produce la activación de genes que codifican entre otros el factor de crecimiento fibroblástico o FGF (en inglés *Fibroblast Growth Factor*), la angiopoyetina-2, y el factor de crecimiento endotelial vascular o VEGF (en inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*) que a través de diferentes vías de señalización, induce la proliferación y la migración de las células endoteliales, la liberación de óxido nítrico (NO, en inglés *Nitric Oxide*) y el aumento de la permeabilidad vascular (Koch *et al.*, 2011; Nuñez *et al.*, 2017; Ollauri-Ibáñez, 2018; Shoeibi *et al.*, 2018). Adicionalmente, además de los factores mencionados, también se ha evidenciado una activación del gen de la endoglina. (Masoud y Li, 2015; Núñez-Gómez *et al.*, 2017).

Además del papel principal de la hipoxia, existen un importante número de genes que responden independientemente de ésta, como los correspondientes a las óxido nítrico sintasas, responsables del tono vascular, las angiopoyetinas, factores de crecimiento fibroblástico y genes involucrados en el metabolismo de la matriz como metaloproteinasas, receptores del activadores e inhibidores del plasminógeno y prolil hidroxilasas del colágeno (Pugh *et al.*, 2003).

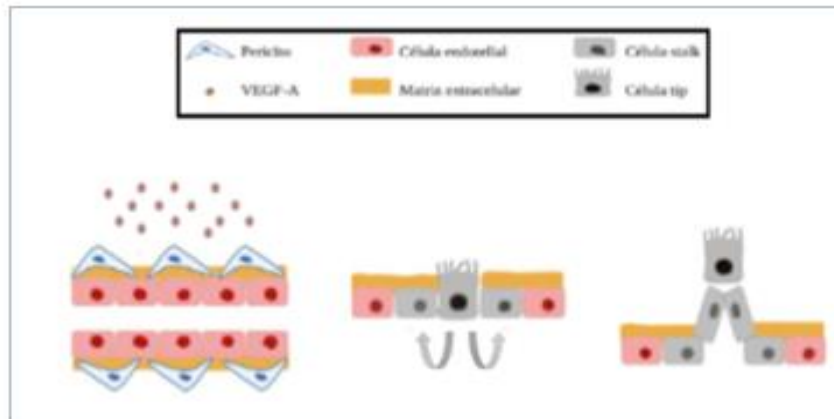
Aunque las células endoteliales han concitado la mayoría de la atención y su activación, proliferación y migración son fundamentales, aisladamente son incapaces de completar una red madura y funcional. El papel de las células murales periendotheliales, las células musculares lisas en grandes vasos y los pericitos en los capilares y las vénulas, protegiendo los neovasos contra la ruptura por el stress hemodinámico o traumático y proporcionando control hemostático, es igualmente determinante (Geudens y Gerhardt, 2011; Núñez-Gómez *et al.*, 2017; Ollauri-Ibáñez *et al.*, 2017).

Las células murales contribuyen a la maduración y el remodelado de los nuevos vasos (en inglés "*vascular pruning*"), requiriendo de proteínas de la matriz extracelular, receptores de moléculas de adhesión y enzimas proteolíticas capaces de degradar la membrana basal para posibilitar la migración de células endoteliales (Carmeliet *et al.*, 2006).

### 1.7.1 ETAPAS ANGIOGÉNICAS

#### 1. Activación endotelial. Sprouting

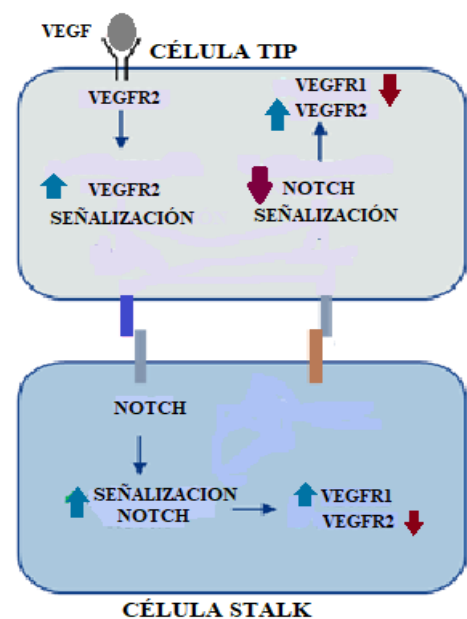
El gradiente VEGF-A induce la diferenciación a célula *tip* o punta, migratorias, generando así un brote, y a la vez una inhibición lateral de las células contiguas, células tallo o *stalk*, impidiéndolas diferenciarse de igual manera (Chapell *et al.*, 2011).



**Figura 23.** Inducción de VEGF-A a células de fenotipo migratorio (tip cells).

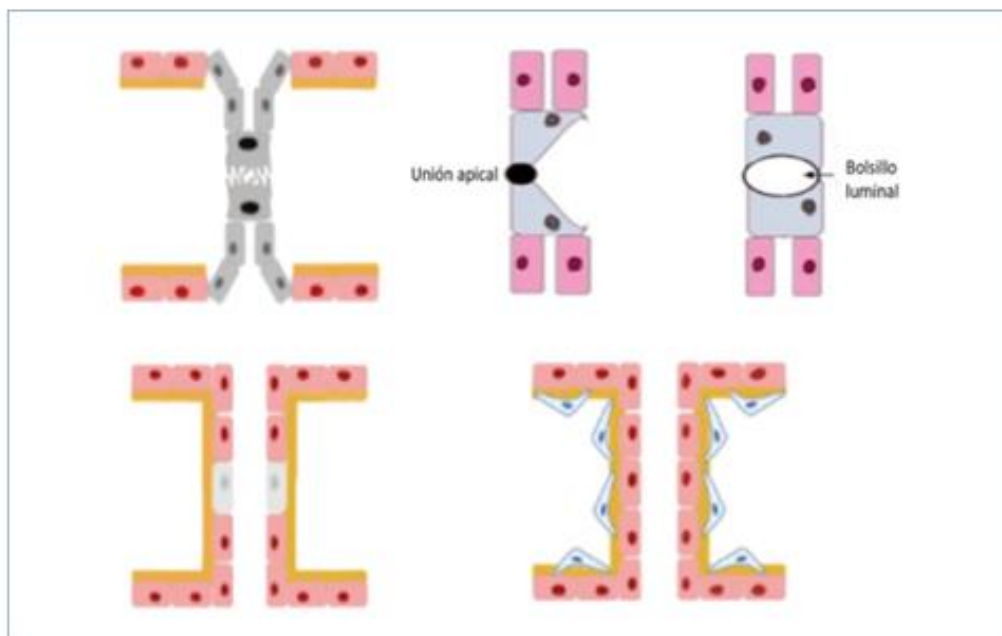
La vía de señalización del fenotipo celular es la vía Notch, un sistema de señalización dependiente del contacto intercelular, muy conservada evolutivamente e implicado en la proliferación y diferenciación de células endoteliales y otros tipos celulares (Blanco y Gerhardt, 2013).

**Figura 24.** Vía Notch. En las células tip la señalización es débil y en las células stalk en cambio muy activa.



## 2. Progresión: crecimiento del sprout

Las células tip liberan MMP que degradan la MEC liberándose a su vez otros factores solubles promigratorios como otras isoformas del VEGF, el factor de crecimiento fibroblástico o FGF (regulador de la proliferación, migración y morfogénesis de células endoteliales) o ligandos de endogлина como el factor de crecimiento transformante  $\beta$  o TGF- $\beta$  (del inglés *Transforming Growth Factor  $\beta$* ) y la proteína morfogenética ósea 9 o BMP-9, (del inglés *Bone Morphogenetic Protein*) (Eilken y Adams, 2010),



**Figura 25.** Progresión en la formación del neovaso: Sprouting.

La fibronectina, la laminina o el colágeno de la MEC interactúan con las células endoteliales modulando la respuesta angiogénica. Simultáneamente, las células stalk y los pericitos, a la inversa de las células tip, liberan inhibidores de las proteasas o TIMP que evitan la degradación de la MEC y así, conforme el nuevo vaso se forma, se sintetiza una membrana basal estabilizadora (Bishop, 2015).

La mayoría de sprouts sufren regresión. Para converger dos sprouts han de anastomosar sus células tips (Siekmann *et al.*, 2013) por cadherinas o glicoproteínas de adhesión de transmembrana calciodependientes. En concreto la VECadherina es responsable de la adhesión celular colaborando así en la migración y polaridad celulares y determinando así la maduración, diferenciación y morfogénesis

tisulares y su integridad. (Lenard *et al.*, 2013). A nivel angiogénico esto supone el branching y el remodelado de venas y arterias y si bien su ausencia no compromete la diferenciación o proliferación endoteliales, impide su supervivencia. Una vez que las células endoteliales se han organizado en vasos primitivos fetales (sin stress hemodinámico), han de remodelarse (*vascular pruning*) antes de establecerse una circulación propia. En esta segunda fase de apoptosis endotelial de la angiogénesis, el papel de VE-cadherina es específico para VEGF (Carmeliet *et al.*, 2006).

### 3. Resolución

La unión de dos células tip de dos sprouts diferentes o la de una célula tip de un sprout con un vaso ya previo, inicia la formación de la luz vascular y el flujo sanguíneo, aumenta la oxigenación de los tejidos y reduce la liberación de factores de crecimiento endotelial por lo que las células del sprout adquieren un fenotipo quiescente.

### 4. Maduración

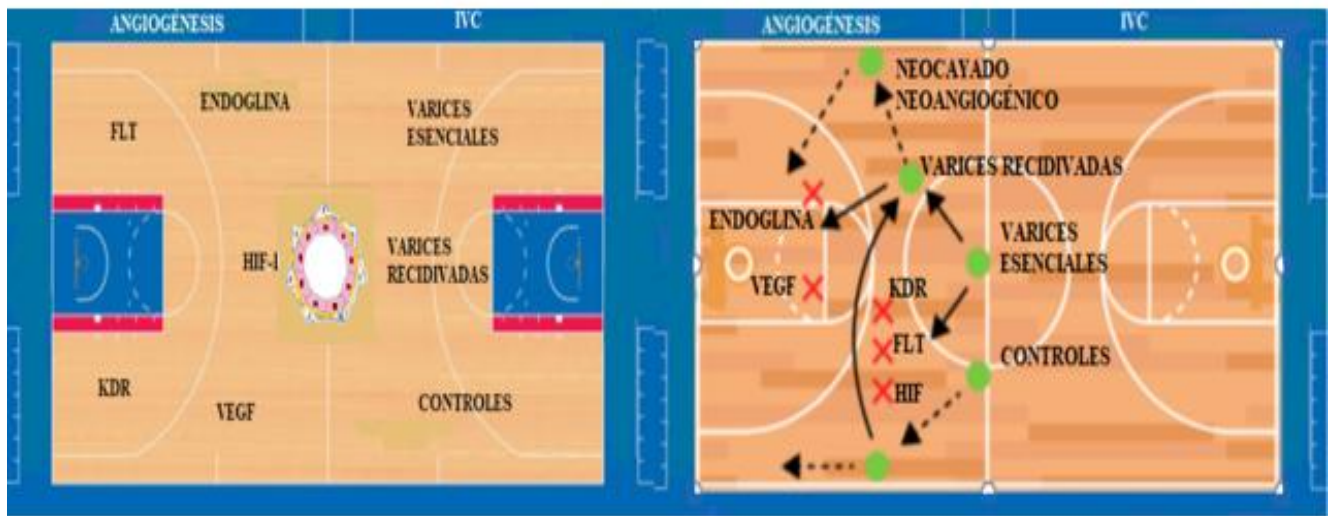
La angiogénesis es inicialmente un proceso rápido que decelera hasta alcanzar un equilibrio impulsado por las demandas metabólicas. Su desarrollo excesivo conduce a la formación de un número mayor de vasos de los necesarios. Ese exceso debe ser modulado con una regresión fisiológica o “pruning” (Augustin *et al.*, 2009; Korn, 2015) y una estabilización y maduración en el que participan como reguladores el factor de crecimiento derivado de plaquetas o PDGF (en inglés *Platelet-Derived Growth Factor*) y la angiopoyetina. (Potente *et al.*, 2011).

Las células endoteliales liberan la subunidad B del PDGF, como potente quimiotáctico de células murales (Andrae *et al.*, 2008). La maduración supone el reclutamiento de células murales, pericitos y células de músculo liso vascular. Esta señalización entre las células murales y las células endoteliales es bidireccional y las células murales también controlan la proliferación endotelial (Kofler *et al.*, 2015; Ogura *et al.*, 2017). El TGF- $\beta$  también participa en la diferenciación de las células murales, en la parada del ciclo celular de las células endoteliales y en la producción de MEC durante la maduración (Gaengel *et al.*, 2009). La angiopoyetina 1 (ANG1), secretada por las células murales, se une a receptores de las células endoteliales y promueve la maduración y la estabilización (Saharinen *et al.*, 2008; Augustin *et al.*, 2009).



Se produce así un intercambio de señalizaciones en un entorno angiogénico entre factores extracelulares, células endoteliales y células murales dependientes de VE cadherina y diferentes integrinas (Núñez-Gómez *et al.*, 2017) y posteriormente las células murales y el endotelio colaborarán en el mantenimiento de la membrana basal (Bishop, 2015; Darland *et al.*, 2003; Logsdon *et al.*, 2014). La respuesta al incremento de la oxigenación por los nuevos plexos angiogénicos, inhibe la señalización de VEGF-A y reduce sus niveles induciendo la apoptosis de las células endoteliales y la regresión de los vasos (Baffert *et al.*, 2006). Este proceso de formación y regresión pueden experimentar ciclos sucesivos como los observados en el cuerpo luteo del ovario (Modlich *et al.*, 1996). El remodelado vascular concluye con la diferenciación en arteria y vena, y en la formación de una nueva red (Ollauri-Ibáñez *et al.*, 2018).

## 1.8 BIOMARCADORES EN ANGIOGÉNESIS



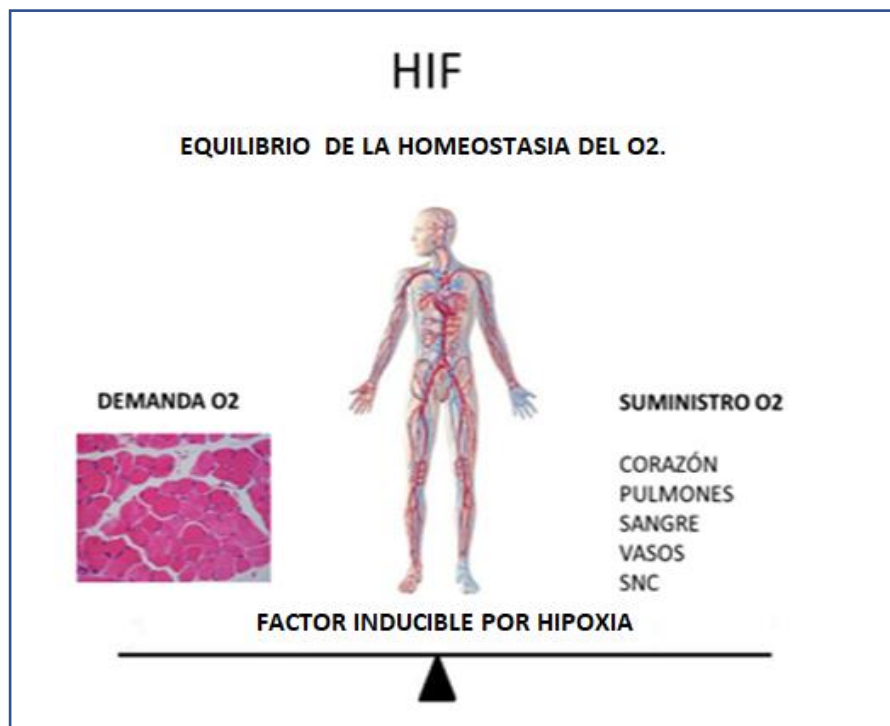
**Figura 26.** Algunos de los protagonistas de la IVC y la angiogénesis.

### 1.8.1 FACTOR TRANSCRIPCIONAL INDUCIBLE POR HIPOXIA (HIF)

En 2019 el Premio Nobel en Fisiología y Medicina fue concedido a los Profesores Gregg Semenza, William Kaelin y Peter Ratcliffe por sus trabajos en la regulación de la expresión de genes sensibles a los cambios de los niveles de oxígeno.

Uno de sus roles principales del oxígeno molecular es el de aceptor terminal de electrones en la respiración mitocondrial intracelular. Igualmente, es requerido en la producción de óxido nítrico, para la hidroxilación del colágeno y la síntesis del colesterol. Además, como subproductos de su metabolismo se forman las formas libres de oxígeno o especies de oxígeno reactivo. Incluyen los iones de oxígeno, los radicales libres y los peróxidos que al disponer de una capa de electrones no apareada son altamente reactivas siendo responsables del daño celular en situaciones de stress oxidativo.

Nuestro metabolismo se ajusta para priorizar su aporte y en esta respuesta adaptativa múltiple se implican desde la función renal en la determinación de los cambios en la masa eritrocitaria, hasta la función del glomus carotídeo en la regulación de la frecuencia respiratoria, o el determinismo de la arquitectura capilar.



**Figura 27.** HIF y Homeostasia del O<sub>2</sub>.

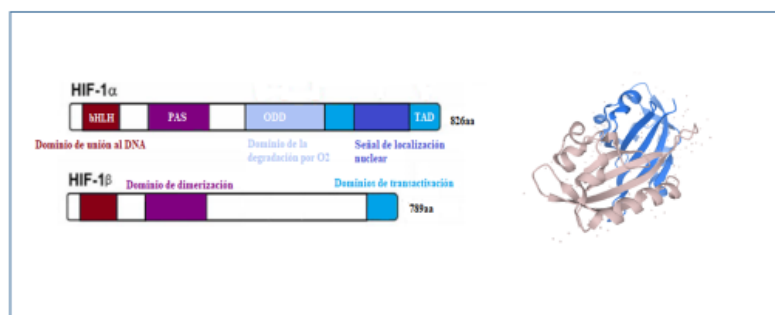
HIF-1 o factor transcripcional inducible por hipoxia tipo 1 (del inglés *Hipoxia-Inducible Factor*) es una familia de factores de transcripción presentes en los mamíferos, que promueven la adaptación a la hipoxia y al metabolismo anaerobio. Su descubrimiento se produjo como consecuencia del estudio de los mecanismos moleculares que modulaban la transcripción de la eritropoyetina (EPO) en respuesta a la hipoxia.

La síntesis de la EPO inducida por la disminución de los niveles en sangre de oxígeno llevó al estudio de su gen y después al del HIF-1 (Semenza *et al.*, 1991). En el gen de la eritropoyetina se descubrieron en 256 pares de bases específicas los elementos de respuesta a la hipoxia hoy denominadas HRE (en inglés *hipoxia responsive element*) (Maxwell *et al.*, 1993). Tales secuencias son los sitios de reconocimiento y unión para factores de transcripción en condiciones de hipoxia o anemia. En 1992 descubrieron una proteína que se unía selectivamente a las secuencias HRE, el HIF (Semenza *et al.*, 1994).

En paralelo se investigaron las causas de la enfermedad de Von Hippel Lindau (VHL), un desorden autosómico dominante con mutaciones en el gen VHL, asociado a cáncer. En este trastorno un defecto en la proteína VHL origina un comportamiento similar a la hipoxia. A partir de estos estudios se describió que VHL media en la degradación de HIF (Maxwell *et al.*, 1999).

En la fisiopatología del HIF-1 se incluyen tanto las situaciones de hipoxia fisiológica transitoria durante el ejercicio, como múltiples situaciones patológicas tanto agudas como crónicas. Como ejemplo de las agudas tenemos la sepsis, traumatismos, hemorragia, deshidratación o situaciones de isquemia reperfusión. Como ejemplo de las crónicas, la enfermedad pulmonar y la adaptación al tabaquismo, la insuficiencia cardiaca, la preeclampsia y el retardo del crecimiento intrauterino, la hipervascularización o hipovascularización retinianas, la enfermedad inflamatoria intestinal, la angiogénesis y el crecimiento tumoral o la cicatrización de heridas (Pugh *et al.*, 2003).

Además, HIF también participa en la reparación celular regulando la transcripción de genes angiogénicos, dos subunidades. La subunidad HIF-1 $\alpha$ , de 120kD, sensible al oxígeno y principal regulador del metabolismo en hipoxia y la subunidad HIF-1 $\beta$  de 91-94 kD, expresada constitutivamente, en las que se han identificado secuencias con funciones específicas. Un dominio bHLH y un dominio PAS involucrados en la unión al DNA y en la dimerización; un dominio ODD de degradación dependiente del oxígeno y de las funciones de transactivación en diferentes condiciones de disponibilidad de O<sub>2</sub> (Masoud y Li, 2015; Basain JM *et al.*, 2017).

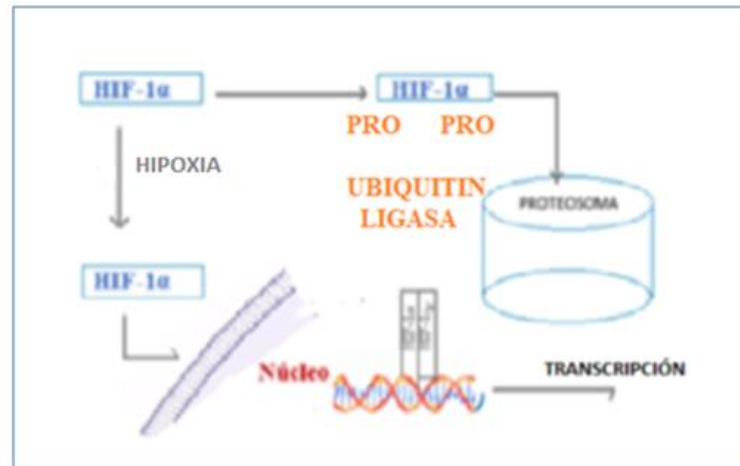


**Figura 28.** Estructura 2D HIF y estructura 3D de HIF1A (Protein Data Bank in Europe).

HIF1 $\alpha$  es inducible. En condiciones de oxigenación normales apenas se detecta al tener una vida de aproximadamente 5 minutos y ser constantemente catabolizado (Salceda y Caro 1997) por protil-hidroxilasas del citoplasma que permiten la unión de HIF1 $\alpha$  a pVHL (proteína del tumor von Hippel Lindau) que es una ubiquitina ligasa que actúa marcando proteínas celulares que han de ser degradadas por el proteosoma, dirigiendo su reciclaje (Jaakola *et al.*, 2001; Kaelin y Ratcliffe, 2008).

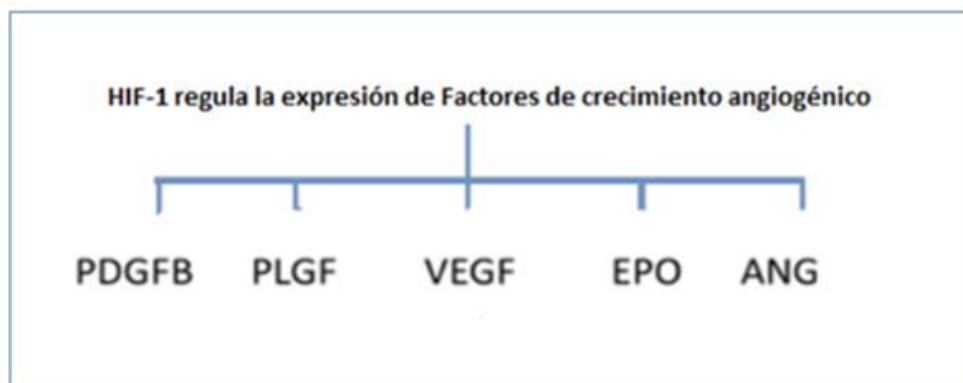
En hipoxia, la protil hidroxilación se suprime, HIF-1 $\alpha$  no se degrada y se heterodimeriza con la subunidad HIF-1 $\beta$ , independiente de la disponibilidad de oxígeno y así forma el factor inducible HIF (Semenza, 2012) que actúa como un factor transcripcional activador de genes diana que poseen secuencias HRE (Pugh *et al.*, 2003). De esta manera similar a la regulación de la expresión de la EPO,

se regula al promotor del VEGF y se pueden sintetizar desde enzimas respiratorias transportadoras y proteínas mitocondriales que reducen la utilización de oxígeno al cambiar el metabolismo oxidativo por el metabolismo glicolítico, a moléculas vasodilatadoras y eritropoyéticas en una respuesta adaptativa integral cuya finalidad es la provisión de oxígeno y su optimización.



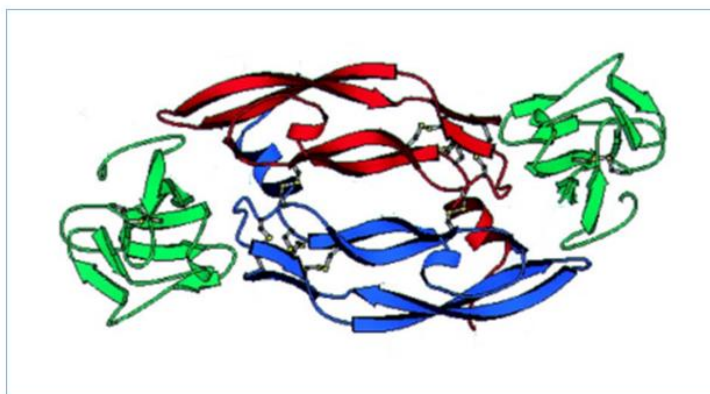
**Figura 29.** Ciclado de HIF-1.

La hipoxia no es el único estímulo que eleva los niveles de HIF-1 $\alpha$ . Muchas citoquinas y factores de crecimiento activadores de receptores del tipo tirosina quinasa (RTKs) son también capaces de inducir HIF-1 $\alpha$ . Se incluyen: insulina 1, factor de crecimiento similar a la insulina 2, interleuquina-1 $\beta$ , factor de necrosis tumoral alfa, factor de crecimiento epidérmico, trombina, endotelina 1. El mecanismo por el que todos ellos inducen HIF-1 $\alpha$  se hace a través del incremento en su síntesis de la proteína, a diferencia de en hipoxia, en que está asociada a una disminución en degradación (Caramelo *et al.*, 2006).



**Figura 30.** HIF como factor de transcripción.

## 1.8.2 FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF)



**Figura 31.** Estructura 3D e interacción de VEGF (en rojo /azul) con el receptor RTK (verde). Modificado de Hubbard (1999).

El factor de crecimiento endotelial vascular VEGF (del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*), es una familia de citoquinas proangiogénicas que inducen la activación de las células endoteliales en la formación de neovasos vía vasculogénesis o angiogénesis. Su principal regulador es el HIF-1, pero su expresión puede ser también regulada en menor medida por otros estímulos como estrógenos, TSH, NO, factores tumorales y distintas citocinas tisulares (Dueñas-Pousa, 2009).

VEGF pertenece a la familia de supergenes de VEGF/PDGF (del inglés *Platelet Derived Growing Factor*) o factor de crecimiento derivado de las plaquetas. Esta familia de proteínas está formada por VEGF- A, VEGF- B, VEGF- C, VEGF- D, VEGF de la glándula endocrina, VEGF- E, VEGF- F y el factor de crecimiento placentario PLGF (del inglés *Placental Growth Factor*) (Patel-Hett y D'Amore, 2011).

Estructuralmente los miembros de la familia VEGF incluyen glicoproteínas homodiméricas de 188 aa y 45kD (Ferrara y Davis Smith, 1997), que se codifican en un gen único del cromosoma 6 en humanos (Olofsson *et al.*, 1996).

VEGF fue descubierto en el sobrenadante de unas células tumorales de ratón y se denominó factor de permeabilidad vascular VPF (del inglés *Vascular Permeability Factor*). Se le creyó responsable del incremento de la permeabilidad vascular necesaria para la angiogénesis (Senger *et al.*, 1986; Shoeibi *et al.*, 2018). Más tarde se le caracterizó como una proteína catiónica capaz de unirse al heparán-sulfato y se demostró su efecto mitogénico en las células endoteliales, por lo que se propuso

el nombre de factor de crecimiento endotelial vascular o VEGF (Ferrara y Henzel, 1989; Leung *et al.*, 1989; Shoeibi *et al.*, 2018).

De todos los miembros de la familia VEGF el más estudiado por su relación con la angiogénesis es VEGF-A. Existen 6 isoformas de VEGF-A de diferentes tamaños en humanos, que se expresan en las células endoteliales, las plaquetas, los macrófagos y las células T activadas, los queratinocitos y los fibroblastos (Shoeibi *et al.*, 2018). Su diversidad de tamaños determina su diferente difusión a través de la matriz extracelular, generándose así un gradiente de citoquinas desde el foco hipóxico: las más pequeñas difunden por la matriz extracelular (MEC), mientras que las mayores quedan retenidas en la MEC, cerca del foco.

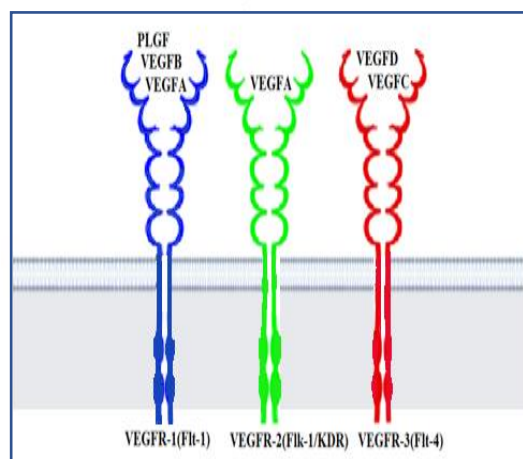
Las células endoteliales expresan dos receptores de membrana para VEGFRs (del inglés *VEGF Receptors type 1 y 2*), VEGFR-1 y VEGFR-2. Al unirse VEGF-A a VEGFR-2 se produce un cambio conformacional y la señalización induce la proliferación y migración endoteliales, la liberación de NO y el aumento de permeabilidad (Koch *et al.*, 2011; Shoeibi *et al.*, 2018). VEGFR-2 media la respuesta angiogénica, pero VEGFR-1 la inhibe al secuestrar VEGF-A e impedir que se una a VEGFR-2 (Hazarika *et al.*, 2007).

VEGF-A es a quien se alude habitualmente cuando explicamos sus funciones angiogénicas, quimiotácticas (para macrófagos y granulocitos) y vasodilatadoras mediante el óxido nítrico, NO. El VEGF-B regula la angiogénesis embrionaria y parece ser miocardio específico induciendo angiogénesis miocárdica (Lhateenvuo *et al.*, 2009). VEGF-C regula la linfagiogénesis y VEGF-D está relacionado con los vasos linfáticos peribronquiolares. Como homólogo del VEGF se ha identificado el factor de crecimiento placentario o PLGF (en inglés *Placental growing factor*). El PLGF solo se une al VEGFR-1, pero puede interactuar con el VEGF formando el heterodímero PLGF/VEGF (Cao *et al.*, 1996) y así proporcionar señales angiogénicas y favorecer el reclutamiento de monocitos (Clauss, 1998).

La haploinsuficiencia del VEGF tras la inactivación de un alelo, ocasiona la muerte embrionaria hacia el día 9, concluyendo que VEGF no es esencial para la diferenciación inicial de los angioblastos, pero un nivel de umbral crítico es necesario para la formación de vasos (Carmeliet *et al.*, 1996).

### 1.8.3 VEGF RECEPTORES

La familia VEGF presenta tres receptores con actividad tirosin quinasa intrínseca. VEGFR-1 o Flt-1 (en inglés *FMS gene like tyrosine kinase 1*), VEGFR-2 o Flk-1 en ratón (en inglés *Fetal Liver Kinase* en ratón) o KDR en humano (en inglés *Kinase insert Domain containing Receptor*), y VEGFR-3 o Flt-4 en células endoteliales y en otros tipos celulares (Thakker *et al.*, 1999).



**Figura 32.** Receptores VEGF. Häggström 2014

VEGF-A, VEGF-B y PLGF se unen a VEGFR-1; VEGF-A a VEGFR-2 y VEGF-C y VEGF-D a VEGFR-3 respectivamente.

El VEGFR-1 se expresa de forma importante a nivel placentario. El VEGFR-2 es el más frecuente; es el mayor mediador de efectos mitogénicos y angiogénicos conocidos, y responsable del aumento de la permeabilidad (Dejana *et al.*, 2008). El VEGFR-3 por su parte estimula la linfagiogénesis (Shibuya, 2011).

VEGF-A, VEGFR-1 y VEGFR-2 desarrollan un importante papel en la angiogénesis fisiológica y tumoral con sobreexpresión de VEGFR-2 en diferentes cánceres como mama, colon y recto, pulmón, cáncer urotelial, melanoma, linfoma y un largo etc (Modi *et al.*, 2019).

Ambos son receptores tirosin quinasa (RTK) con un dominio extracelular de unión al ligando, uno de transmembrana y un dominio tirosin-quinasa. Las tirosin-quinasa, de las que se conocen más de 100 tipos diferentes, son proteín-quinasa que catalizan la transferencia de un grupo fosfato desde ATP a un residuo de tirosina. Esta fosforilación es esencial en la transmisión de señales intra e intercelulares.



VEGFR-1 o Flt-1, con una masa de 180kDa es expresado en células endoteliales, monocitos y macrófagos, células hematopoyéticas y en células dendríticas y pericitos bajo condiciones de hipoxia (Takahashi *et al.*, 2005; Dikov *et al.*, 2005). VEGFR-1 tiene una gran afinidad por VEGF-A, pero una débil actividad como tirosin-kinasa. Actúa atrapando el VEGF y reduciendo su concentración localmente en la proximidad de VEGFR-2, suprimiendo así las señales proangiogénicas. Actúa como un regulador negativo reduciendo la fosforilización de la tirosin-kinasa durante la embriogénesis, estableciendo un balance crítico para una vasculogénesis fisiológica (Tahashi y Shibuya, 2005; Shibuya, 2006). Tal es así que los ratones mutantes carentes de VEGFR-1 presentan un sobrecrecimiento vascular incompatible con la vida (Roberts *et al.*, 2004).

Adicionalmente en el *sprouting* endotelial, el exceso de ligando o la pérdida genética por delección de VEGFR-1 presentará un crecimiento de los neovasos en dirección hacia zonas avasculares y desestabilización, pudiendo así colapsarse. Esto plantea que VEGFR-1 actúa suavizando o modulando la señalización VEGFR-2 (Chappell *et al.*, 2016).

VEGFR-1 también es un regulador positivo de la inflamación mediada por los macrófagos involucrándose en enfermedades inflamatorias como en la artritis reumatoide (De Bandt *et al.*, 2003), en la angiogénesis tumoral y las metástasis en adultos (Luttun *et al.*, 2002).

VEGFR2 tiene una masa de 200-230 kDa. Se expresa en células endoteliales y linfáticas, en megacariocitos y stem cells hematopoyéticas. Es el regulador mediador principal de los efectos mitogénicos, angiogénicos y de incremento de la permeabilidad de VEGFA en las células endoteliales y sus niveles en la vasculogénesis y en la angiogénesis se encuentran elevados. (Olsson *et al.*, 2006; Modi y Kulkarni, 2019).

## **1. Efectos del VEGF en la angiogénesis**

VEGF actúa como una citokina proinflamatoria incrementando la permeabilidad de las células endoteliales y estimulando el crecimiento vascular endotelial. Así favorece la llegada de proteínas plasmáticas y la entrega de oxígeno y nutrientes, y la formación de un gel de fibrina extravascular como medio favorable a las células endoteliales. En tumores su sobreexpresión se ha correlacionado con una mayor proliferación y riesgo de metástasis. Al incremento de la permeabilidad también contribuye el estimular la producción de NO vía NOS (NO sintasa) y eNOS (endotelial) (Gerber HP *et al.*, 1998).

Adicionalmente presenta propiedades citoprotectoras sobre las células endoteliales, incluyendo la expresión de proteínas antiapoptóticas (Caramelo et al., 2003).

También es fuertemente expresado en los queratinocitos durante la cicatrización (Ferrara y Davis-Smyth, 1997) facilitando la penetración de los fibroblastos y su síntesis de colágeno, y los aportes para sintetizar la matriz extracelular MEC que actúa, además de como estroma y andamiaje para las células, como lugar de almacenaje para los factores de crecimiento angiogénicos (Weis *et al.*, 2004). En esta interacción entre citoesqueleto y MEC se establecen contactos por integrinas que permiten que las vías de señalización reciban los factores de crecimiento para la proliferación y la supervivencia de las células vasculares. En este proceso también las plaquetas activadas liberan desde sus gránulos  $\alpha$  lipasas, proteasas, y factores como VEGF y factor de crecimiento derivado de plaquetas o PDGF (del inglés *Platelet Derived Growth Factor*).

Si VEGF se regula por la hipoxia mediante HIF-1 $\alpha$  promoviendo la formación de neovasos, también el propio VEGF puede estimular la producción de HIF-1 $\alpha$  en una regulación bidireccional, en ausencia de hipoxia y en respuesta al ion superóxido que actúa como mediador inflamatorio. El VEGF estimula la producción de ion superóxido que tiene un papel crítico en este feedback que conduce a la elevación de HIF-1 $\alpha$  (Deudero *et al.*, 2008).

Aunque las células endoteliales son la diana principal del VEGF, también regula el crecimiento linfático y está correlacionado con otros tipos celulares. Así, durante la embriogénesis vasos y nervios se desarrollan en paralelo y comparten reguladores comunes. Los nervios periféricos expresan VEGFR-1 y VEGFR-2 y la hipoxia aumenta su expresión en algunas neuronas (Wick *et al.*, 2002). El VEGF-B también estimula el crecimiento de los nervios simpáticos en el corazón como un mecanismo compensatorio dirigido a conservar la contractilidad (Chen *et al.*, 2001) y sobre las stem cells de la médula ósea promoviendo su diferenciación en cardiomiocitos (Chen *et al.*, 2006) y en células endoteliales (Blancas *et al.*, 2008), e induce la proliferación de fibroblastos (Prabhu *et al.*, 2016) y su activación a miofibroblastos (Zhao *et al.*, 2016). Los fibroblastos bajo la influencia del VEGF-A su vez pueden transdiferenciarse en células endoteliales y en miocardiocitos (Qian *et al.*, 2012; Yamakawa *et al.*, 2015).

El VEGF igualmente actúa sobre las células musculares lisas y sobre los pericitos. En las fases precoces de la angiogénesis las células murales permiten la proliferación y migración, y en las tardías los pericitos previenen de la regresión y proporcionan soporte mecánico y funcional (Ishida *et al.*, 2001).

## 2. VEGF y patogénesis

La familia de VEGF y sus receptores participan en la patogénesis de diferentes enfermedades. Un exceso de VEGFR-1 se ha relacionado con el retraso del crecimiento intrauterino y la preeclampsia, derivados de la afectación placentaria (Sharma *et al.*, 2016; Suzuki *et al.*, 2018).

Las mutaciones de VEGFR o de genes que afectan a la señalización del VEGF se han relacionado con hemangiomas infantiles (Kleinman *et al.*, 2007) y con malformaciones arteriovenosas, donde se han detectado incremento de los niveles de VEGF-A (Koizumi *et al.*, 2002). En los hemangiomas se ha identificado células estromales que expresan VEGF-A. El propranolol ha mostrado reducir la expresión de VEGFR y la secreción de VEGF-A regulando a la baja el AMPc (Chim *et al.*, 2012).

También se ha estudiado el VEGF en respuesta al traumatismo vascular y al daño endotelial. En la homeostasis vascular se inducen cambios moleculares y celulares dentro de la luz y la pared. El aumento de la producción de VEGF en traumatismos leves tendrían como diana las células endoteliales favoreciendo la reendotelización e inhibiendo la neointima, (Hausner *et al.*, 1999). En los traumatismos más severos las células musculares lisas quedarían expuestas y el VEGF favorecería su migración y proliferación, acompañándose de un aumento de MMP2 y 9, y de una proliferación neointimal en la que se registran cifras elevadas de KDR (Bruczko *et al.*, 2016).

### 1.8.4 ENDOGLINA

#### 1. Expresión y distribución celular de la endoglina

La endoglina o Eng, CD105 (del inglés *Cluster of Differentiation*) es una glicoproteína de transmembrana. Fue identificada en las células endoteliales a mediados de los años 80, con el anticuerpo monoclonal 44G4 contra células linfoblásticas humanas. El gen de la endoglina humana (ENG) está localizado en el cromosoma 9q34 (Fernández-Ruiz *et al.*, 1993).

Varias líneas de investigación han descrito su función en la angiogénesis, en el desarrollo cardiovascular y en el remodelado vascular (Fonsatti *et al.* 2001; Duff *et al.*, 2003). Su presencia en las células de las tres capas de la pared vascular (íntima, media y adventicia), sugiere un importante papel en la fisiología vascular estando muy involucrada en la función del endotelio y en la homeostasis

vascular y como molécula proangiogénica desempeña un papel regulador en la angiogénesis (López Novoa y Bernabeu, 2010).

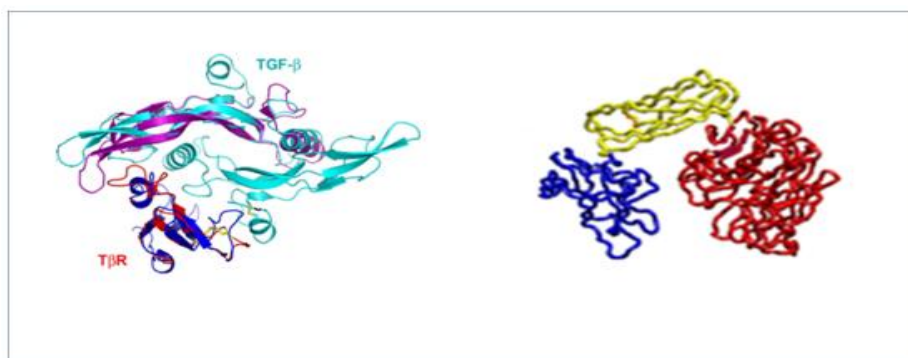
Su expresión reducida en las líneas celulares de endotelio, músculo liso vascular y fibroblastos, la ha relacionado con la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria o HHT (en inglés *Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia*) conocida como síndrome de Rendu-Osler-Weber, confirmando que su presencia en estos tipos celulares es imprescindible (Marchuk, 1998).

La HHT es una enfermedad rara con telangiectasias en la cara y las mucosas buconasales y las manos que ocasiona hemorragias graves y frecuentes por la fragilidad vascular consecuencia de una angiogénesis alterada (Mahmoud *et al.*, 2010 y 2011; Ruiz-Llorente *et al.*, 2017). Además, también pueden presentarse malformaciones arteriovenosas en el cerebro, hígado y tracto gastrointestinal (Shovlin y Letarte, 1999). Se conocen seis tipos de HHT causadas por mutaciones en diferentes genes relacionados con la vía de señalización del TGF- $\beta$ , pero el 90% de los casos pertenecen a la HHT-1 por haploinsuficiencia de la endogлина o a la HHT-2 por mutaciones en el gen ALK1 (en inglés *Anaplastic lymphoma kinase receptor*) (McDonald *et al.*, 2015).

Su expresión predominantemente endotelial la convierte así en un mejor marcador de células endoteliales que otros propuestos anteriormente como el VEGFR-2, ciertas moléculas de adhesión como ICAM (en inglés *Intercellular adhesion molecule*), PECAM (*platelet-endotelial adhesion molecule*) y VCAM (*vascular adhesion molecule*), o el factor de coagulación de von Willebrand (vWF, del inglés *von Willebrand Factor*) (Gougos y Letarte, 1988; Graulich *et al.*, 1999). Tal expresión se ha demostrado tanto en adultos como durante la embriogénesis (Arthur *et al.*, 2000), y tanto en arterias como en venas (Mahmoud *et al.*, 2009).

Alternativamente, también se ha demostrado su expresión en las células de músculo liso vascular y en los pericitos (Conley *et al.*, 2000; Rivera y Brekken, 2011), en el sincitiotrofoblasto placentario (Gougos *et al.*, 1992), y en menor medida en células de origen hematopoyético como los precursores de células B (Zhang *et al.*, 1999), los proeritroblastos (Buhring *et al.*, 1991), en células estromales de la médula ósea (Rokhlin *et al.*, 1995) y los macrófagos (O'Connell *et al.*, 1992), los fibroblastos (Gougos y Letarte, 1988a), los condrocitos (Parker *et al.*, 2003), las células mesangiales de riñón (Diez-Marques *et al.*, 2002) y en las células estrelladas del hígado (Meurer *et al.*, 2005).

## 2. Estructura de la endoglina



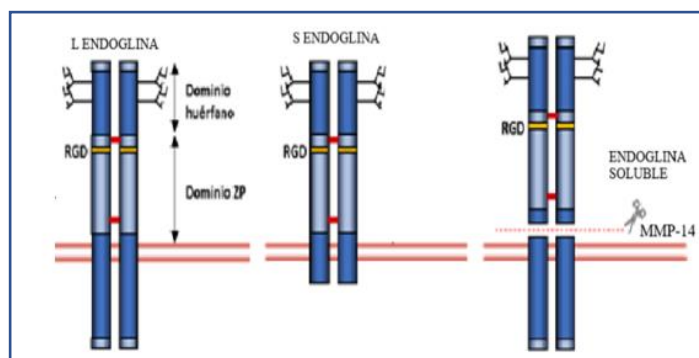
**Figura 33.** Estructuras 3D del TGFβ y TβR y de la Endoglina (Radaev *et al.*, 2010 y Llorca *et al.*, 2007).

Es una glicoproteína homodimérica tipo I, con dos monómeros de 90 kDa unidos mediante puentes disulfuro. Su estructura primaria consta de 658 aminoácidos de 180 kDa de peso molecular; 561 aminoácidos corresponden al dominio extracelular y 47 a la cola citoplasmática.

En el dominio extracelular presenta una zona que interacciona con ligandos de la superfamilia del factor de crecimiento transformante TGF (del inglés *transforming growth factor*), y un dominio de yuxtamembrana o zona pelúcida (ZP), muy conservada en las especies, donde destaca la secuencia RGD, un tripéptido Arg399-Gly400-Asp401 implicado en interacciones basadas en integrinas a nivel plaquetario y leucocitario, y en la adhesión celular. La adhesión participa en la hemostasis, la trombosis y la inflamación, fenómenos en los que el endotelio juega un papel muy importante (Gougos y Letarte, 1990; Jovine *et al.*, 2005; Rossi *et al.*, 2013 y 2017). Tras ese dominio, una región de transmembrana y finalmente, un pequeño dominio citoplasmático C-terminal, que a pesar de no tener actividad enzimática, es rico en serinas y treoninas susceptibles de ser fosforiladas por los receptores de TGF ALK1 y TBR2 (Koleva *et al.*, 2006; Lastres *et al.*, 1994; Pan *et al.*, 2014).

Además de esta isoforma predominante de L-endoglina también se ha descrito en humanos y ratón una isoforma minoritaria de tallo citoplásmico más corto denominada S-endoglina, (Bellón *et al.*, 1993; Pérez-Gómez *et al.*, 2005). La S-endoglina carece de dianas de fosforilización. Su papel está aún poco estudiado pero su expresión se induce durante la senescencia en las células endoteliales y los macrófagos (Blanco *et al.*, 2008; Aristorena *et al.*, 2014), lo que ha sugerido su papel en un mayor daño en la revascularización en ancianos (Faber *et al.*, 2011).

Las diferentes propiedades celulares observadas en la expresión de L-endoglina o S-endoglina sugieren que el dominio intracelular es esencial en la modulación de los diferentes procesos celulares (Velasco *et al.*, 2008).



**Figura 34.** Isoformas de endoglina con diferente dominio citoplasmático. La endoglina soluble es la forma circulante producida por proteólisis de ambas. Ollauri-Ibáñez C. Efecto de la sobreexpresión de endoglina sobre la angiogénesis tumoral y fisiológica. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca., 2018.

Aparte de estas dos isoformas, existe un tipo de endoglina circulante o soluble (sEng) liberada por la acción de MMP-14 sobre las isoformas anteriores unidas a la membrana (Hawinkels *et al.*, 2010; Valbuena-Diez *et al.*, 2012). Se han detectado altas concentraciones de sEng en pacientes con cáncer. (Fonsatti *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2000), preeclampsia (Malhotra *et al.*, 2013) y en afecciones cardíacas (Kapur *et al.*, 2013).

Pero a sEng también se le han atribuido propiedades antiangiogénicas y se ha demostrado que sEng inhibe la formación de capilares *in vitro* (Venkatesha *et al.*, 2006). Su unión a los ligandos TGF- $\beta$  o BMP (en inglés *Bone Morphogenic Protein*), interfiere la unión a las endoglinas de membrana del complejo de receptores de TGF- $\beta$ , impidiendo la señal angiogénica (Castonguay *et al.*, 2011; Ollauri-Ibáñez *et al.*, 2017).

### **3. Funciones de la Endoglina: regulación de la señalización del TGF- $\beta$**

La superfamilia TGF- $\beta$  comprende además del TGF- $\beta$  y sus isoformas TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 (el factor mejor estudiado) un gran número de proteínas adicionales que constituyen 33 ligandos: diez proteínas morfogenéticas óseas (BMP), activinas, inhibinas, factores de crecimiento y diferenciación entre otros (Morikawa *et al.*, 2016).

Pese a sus similitudes estructurales tienen multitud de funciones vinculadas al desarrollo y la diferenciación celulares y al mantenimiento de la homeostasia de los tejidos, desarrollando funciones en la cicatrización y regeneración tisulares y en la respuesta inmune, desde el embrión al adulto. Sus efectos son contextuales y en las mismas células en condiciones variables o con la coestimulación de otras citoquinas pueden modificar su respuesta.

Su función mejor descrita es su papel como supresor tumoral (Massagué, 2008). En las primeras fases tumorales, la señalización por TGF- $\beta$  induce de una parada de ciclo y así se controla el crecimiento celular desordenado. Sin embargo, en estadios avanzados, el TGF- $\beta$  promueve la progresión tumoral y las metástasis mediante la inducción de la angiogénesis y el escape de células al sistema de inmunovigilancia (Horbelt *et al.*, 2012).

También se le ha relacionado con un aumento de la síntesis de MEC en fibroblastos (Verrecchia y Mauviel, 2007), esencial en los procesos de cicatrización. Alternativamente, las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), además de actuar en la diferenciación del hueso también se han implicado en la angiogénesis induciendo la maduración al inhibir la proliferación y migración (David *et al.*, 2009).

**Tabla 1.** Familia de TGF Modificado de Morikawa *et al.*, 2016.

Protein name	Official gene symbol (human)	Protein name synonyms
TGF- $\beta$ 1	<i>TGFB1</i>	CIF-A (cartilage-inducing factor-A), differentiation-inhibiting factor
TGF- $\beta$ 2	<i>TGFB2</i>	G-TsF (glioblastoma-derived, T-cell suppressor factor), BSC-1 GI (BSC-1 cell-growth inhibitor), polyergin, CIF-B (cartilage-inducing factor-B)
TGF- $\beta$ 3	<i>TGFB3</i>	
Inhibin $\alpha$	<i>INH A</i>	Inhibin A and B <sup>a</sup>
Inhibin $\beta_A$	<i>INH B A</i>	Inhibin A and activin A or AB, <sup>a,b</sup> FRP (follicle-stimulating hormone-releasing protein), EDF (erythroid differentiation factor), XTC-MIF ( <i>Xenopus</i> XTC cell mesoderm-inducing factor)
Inhibin $\beta_B$	<i>INH B B</i>	Inhibin B and activin B or AB, <sup>a,b</sup> XTC-MIF
Inhibin $\beta_C$	<i>INH B C</i>	Activin C <sup>c</sup>
Inhibin $\beta_E$	<i>INH B E</i>	Activin E <sup>c</sup>
Nodal	<i>NODAL</i>	BMP-16 (bone morphogenetic protein-16)
Myostatin	<i>MSTN</i>	GDF-8 (growth and differentiation factor-8)
BMP-2	<i>BMP2</i>	
BMP-3	<i>BMP3</i>	Osteogenin
BMP-4	<i>BMP4</i>	BMP-2B
BMP-5	<i>BMP5</i>	
BMP-6	<i>BMP6</i>	Vgr1 (Vg1-related protein)
BMP-7	<i>BMP7</i>	OP-1 (osteogenic protein-1)
BMP-8A	<i>BMP8A</i>	OP-2
BMP-8B	<i>BMP8B</i>	OP-3
BMP-9	<i>GDF2</i>	GDF-2
BMP-10	<i>BMP10</i>	
GDF-1	<i>GDF1</i>	
GDF-3	<i>GDF3</i>	Vgr2
GDF-5	<i>GDF5</i>	CDMP-1 (cartilage-derived morphogenetic protein-1), BMP-14
GDF-6	<i>GDF6</i>	CDMP-2, BMP-13
GDF-7	<i>GDF7</i>	CDMP-3, BMP-12
GDF-9	<i>GDF9</i>	
GDF-9B	<i>BMP15</i>	BMP-15
GDF-10	<i>GDF10</i>	BMP-3b
GDF-11	<i>GDF11</i>	BMP-11
GDF-15	<i>GDF15</i>	Placental TGF- $\beta$ , placental BMP (PLAB), PDF (prostate-derived factor), NAG-1 (nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1), MIC-1 (macrophage inhibitory cytokine-1)

La Endoglina actúa como un receptor auxiliar en el complejo receptor para varios miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$ . Interactúa con los receptores de TGF- $\beta$  tipo I y tipo II (T $\beta$ R-I y T $\beta$ R-II, respectivamente) para conformar el complejo del receptor TGF- $\beta$  e iniciar y modular su cascada de señalización. (Cheifetz *et al.*, 1992, Lastres *et al.*, 1996; Wong *et al.*, 2000) mediante la fosforilación de proteínas Smad que penetran en el núcleo y promueven la expresión de varios genes proangiogénicos cuya diana son las células endoteliales que adquieren un fenotipo proangiogénico favoreciendo la proliferación y migración y la degradación de la MEC e inversamente en ausencia de endoglina o en presencia de S Endoglina la señalización alternativa favorece un endotelio menos proliferativo y migratorio. (Velasco *et al.*, 2008; Núñez-Gómez *et al.*, 2017; Ollauri-Ibáñez *et al.*, 2017).



En la mayoría de células, la señalización del TGF- $\beta$  se efectúa por el receptor tipo I ALK5 (en inglés *Activin receptor-like kinase 5*). En el endotelio se produce por el ALK1 (en inglés *Activin receptor-like kinase 1*) y sus ligandos principales son TGF- $\beta$ 1 y BMP9 (Saito *et al.*, 2017).

Cuando el TGF- $\beta$ 1 se une al receptor de tipo II o T $\beta$ R-II, el receptor de tipo I ALK1 y endogлина son reclutados y fosforilados, desatando una cascada señalizadora mediante la fosforilación de las Smad 1/5/8 que se unen a la Smad 4 promoviendo la expresión de genes proangiogénicos cuya diana son las células endoteliales que adquieren un fenotipo proangiogénico, incrementando su proliferación y migración, y la degradación de la MEC. Al contrario, en ausencia de endogлина o en presencia de S Endogлина la señalización es por ALK5 y la vía Smad 2/3 que favorece un endotelio menos proliferativo y migratorio. (Velasco *et al.*, 2008; Núñez-Gómez *et al.*, 2017; Ollauri-Ibáñez *et al.*, 2017).

Algunos trabajos han sugerido que endogлина puede tener funciones independientes a la modulación de TGF- $\beta$ . La sobreexpresión de endogлина afecta a la adhesión celular en ausencia de TGF- $\beta$  (Guerrero-Esteo *et al.*, 1999). Además, endogлина participa en la organización del citoesqueleto (Conley *et al.*, 2004; Sanz-Rodríguez *et al.*, 2004) y protege frente a la apoptosis producida por la hipoxia (Li *et al.*, 2003).

#### **4. Expresión en tejidos neoangiogénicos**

La expresión de endogлина se regula durante el desarrollo cardiaco (Arthur *et al.*, 2000) y aumenta durante la formación de los tabiques y las válvulas cardiacas (Qu *et al.*, 1998).

Su papel protagonista en la angiogénesis y la morfogénesis vascular se confirmó con los embriones *knockout* para endogлина, que mueren hacia la mitad de la gestación, entre los días 10-11 por deficiencias de la vasculogénesis del saco vitelino y en el desarrollo cardiovascular (Bourdeau *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999). Los fallos en el remodelado vascular primitivo originan vasos inmaduros anormalmente frágiles responsables de hemorragias internas fatales. También presentan malformaciones valvulares y de la tabicación cardiaca embrionaria (Arthur *et al.*, 2000). Los ratones nulos ALK1 y T $\beta$ R-II mueren debido a alteraciones vasculares similares, implicándose no sólo el endotelio sino también una reducción de las células musculares lisas murales (Martin *et al.*, 1995; Oh *et al.*, 2000). En la misma dirección, la delección de endogлина en células endoteliales modifica la

señalización de VEGF al alterar la cinética de VEGFR-2 inducida por VEGF-A, aunque no se conoce por completo su mecanismo (Jin *et al.*, 2017)

Alternativamente, la endoglina se sobreexpresa en el frente vascular del endotelio activado en respuesta a una lesión, y se la ha involucrado en múltiples respuestas celulares en tejidos en los que se produce angiogénesis probablemente a través de un mecanismo mediado por la hipoxia (Sánchez-Elsner *et al.*, 2002). En concreto, endoglina se sobreexpresa en el frente vascular donde se localiza el sprouting (Barnett *et al.*, 2014) Sus niveles aumentan tras el infarto de miocardio, y la recuperación del área infartada depende de su expresión (Van Laake *et al.*, 2006). También se ha observado en los vasos sanguíneos que han sufrido un daño vascular (Muñoz *et al.*, 2012), tras la inducción de la angiogénesis en la retina (Barnett *et al.*, 2014) y durante la angiogénesis patológica de la colitis crónica (Ardelean *et al.*, 2014), y de tumores sólidos (Pauwe *et al.*, 2013), y se ha identificado como biomarcador en ciertas patologías cardiovasculares como la preeclampsia (Leaños *et al.*, 2019) o aquellas relacionadas con la disfunción endotelial y la hipercolesterolemia entre otras (Rathouska *et al.*, 2015).

Aunque la endoglina es un marcador predominantemente endotelial que se expresa en mayor medida en venas y capilares que en arterias (Mahmoud *et al.*, 2010), También se expresa en las células murales. Interacciona con las integrinas de las células murales favoreciendo su adhesión al endotelio y la maduración vascular (Rossi *et al.*, 2016). Por ello se plantea su implicación en la diferenciación arteriovenosa. Adicionalmente, se ha observado que la delección de endoglina en embriones de ratón se asocia a la expresión de marcadores venosos en arterias (Mancini *et al.*, 2009).

El gen de endoglina presenta en su promotor una secuencia HRE, moduladora de la respuesta transcripcional a HIF-1 $\alpha$ , promoviendo su expresión. Tanto los promotores de TGF- $\beta$ 1 como de VEGF, también tienen una secuencia HRE, e igualmente estimulan la expresión de endoglina y de HIF-1 $\alpha$  (Sánchez-Elsner *et al.*, 2001; Hung *et al.*, 2013; Núñez-Gómez *et al.*, 2017).

El aumento de la expresión de endoglina por el TGF- $\beta$ 1 (Sanchez-Elsner *et al.*, 2002), lo sugiere que la expresión de endoglina puede regularse mediante una cooperación sinérgica entre la hipoxia y el TGF- $\beta$ 1 debido a la presencia de HRE en sus promotores de genes, y el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 puede aumentar la expresión de HIF-1 $\alpha$  en células endoteliales tanto en condiciones hipóxicas como normóxicas. (Basu *et al.*, 2011) y de manera alternativa, la hipoxia también puede estimular su expresión indirectamente mediante la activación de la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos MAPK (en inglés *Mitogen-Activated Protein Kinases*) (Zhu *et al.*, 2003).

## 5. Endogлина en el reclutamiento de progenitores endoteliales

Las poblaciones de células progenitoras endoteliales EPC (en inglés *Endothelial Progenitor Cells*) derivadas de la médula ósea del adulto se movilizan a la circulación mediante estímulos como los estrógenos y el VEGF (Lyden *et al.*, 2001). Se han caracterizado dos poblaciones. Por un lado, las EPC tempranas, de perfil hematopoyético, y por otro las EPC tardías, con un rasgo genómico similar al endotelio y capacidad de formar brotes angiogénicos in vitro (Martín Ramírez *et al.*, 2012). Además, una fracción de las células endoteliales en la pared vascular son las llamadas “células precursoras residentes” (Zengin *et al.*, 2006). Las EPC, circulantes o residentes, pueden diferenciarse en EC maduras. Se cree así que las EPC intervienen en la angiogénesis, y como reservorio de reemplazo de las células endoteliales disfuncionales o senescentes (Reyes *et al.*, 2002; Goon *et al.*, 2006).

Los niveles de EPC circulantes aumentan después de una lesión vascular y en varias enfermedades se relacionan con la regeneración de la vascularización después de una lesión (Gill *et al.*, 2001). La Endogлина, expresada por células endoteliales maduras (Pelosi *et al.*, 2012), puede también expresarse por EPC después de la diferenciación impulsada por VEGF en células endoteliales (Bagley *et al.*, 2005).

## 6. Endogлина en la inflamación y en la insuficiencia venosa crónica

En la inflamación, los niveles de endogлина aumentan. Se ha confirmado su expresión en células monocíticas y en células epiteliales (López Novoa *et al.*, 2010). Alternativamente, la endogлина de las células endoteliales interacciona con la integrina  $\alpha 1\beta 5$  de los leucocitos, regulando su adhesión y trans migración (Rossi *et al.*, 2013).

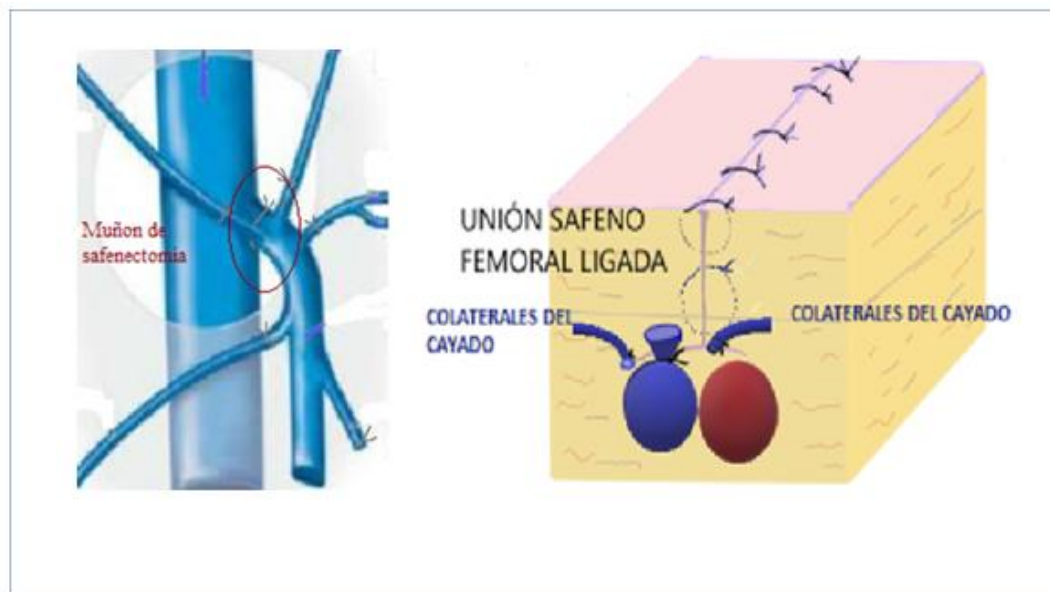
Las células endoteliales de pacientes con IVC muestran un fenotipo proinflamatorio, mayor cuanto más avanzada es la enfermedad (Tisato *et al.*, 2012).

Respecto a la IVC, solo existe una publicación que estudió los niveles de sEng y TGF- $\beta$  en úlceras, comparando la concentración de sEng en el exudado en la fase inflamatoria y en la fase de granulación post-tratamiento, observando en estas últimas mayores niveles de endogлина soluble lo que probablemente afecta a la adhesión leucocitaria, reduciendo la respuesta inflamatoria favoreciendo la cicatrización (Ligi *et al.*, 2017).

**Tabla 2.** Niveles de Endoglina y eventos vasculares. (Nuñez Gómez *et al.*, 2017).

Expresión reducida de endoglina	Aumento de la expresión de endoglina
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reperusión tardía y vascularización alterada después de isquemia de las extremidades.</li> <li>• Reducción de la tasa de crecimiento tumoral y la densidad capilar tumoral.</li> <li>• Compromiso de la revascularización después del infarto de miocardio.</li> <li>• Defectos en la maduración de vasos y reclutamiento de células murales.</li> <li>• Reducción de la producción de VEGF por células endoteliales macrovasculares.</li> <li>• Aumento de la producción de VEGF por EC microvasculares o tejido angiogénico.</li> <li>• Reducción de proliferación y / o migración de la CE.</li> <li>• Aumento de las tasas de proliferación y / o migración de la CE.</li> <li>• Compromiso del sprouting en respuesta a VEGF.</li> <li>• Aumento de la permeabilidad endotelial y / o metástasis.</li> <li>• Alteración diferenciación y reclutamiento de células progenitoras endoteliales.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lesión cardíaca y vascular.</li> <li>• Angiogénesis inducida por oxígeno en la retina normal.</li> <li>• Angiogénesis patológica en colitis crónica.</li> <li>• Vascularización tumoral</li> </ul>

## 1.9 NEOANGIOÉNESIS Y CICATRIZACION



**Figura 35.** Unión safenofemoral y entorno cicatricial.

La recidiva varicosa por neocayado neangiogénico se desarrolla en el entorno cicatricial del abordaje de la intervención previa de la unión safenofemoral por varices esenciales.

La cicatrización de las heridas presenta una compleja cascada de fenómenos celulares que ordenamos en fases. La hemostasia inicial supone la formación del coágulo y una matriz provisional de fibrina y fibronectina que proporcionan un andamiaje para las migraciones posteriores de células inflamatorias, endoteliales y mesenquimales. Esta fase inicial inflamatoria se prolonga entre los días 2 y 5 y tras ella la fase proliferativa se prolonga hasta las tres semanas con formación de un tejido de granulación compuesto de fibroblastos y en menor medida células musculares lisas, macrófagos y células endoteliales, reemplazando la matriz de fibrina por colágeno tipo III.

En esa primera fase inflamatoria se produce el reclutamiento y la infiltración de células fagocíticas activadas, neutrófilos y macrófagos principalmente, y también linfocitos y mastocitos en menor medida. Se liberan ROS o especies reactivas de oxígeno (en inglés *Reactive Oxygen Species*) que incluyen oxígeno, radicales libres y peróxidos antioxidantes con poder bactericida para así prevenir la infección (Babior *et al.*, 1973). Específicamente  $H_2O_2$  es relativamente estable, y puede atravesar la membrana actuando como mensajero celular, induciendo específicamente la expresión de VEGF en queratinocitos sin la mediación por HIF-1, mediante una vía diferente induciendo la fosforilización de la tirosina, y estimular la síntesis de colágeno (Sen *et al.*, 2002). También se ha

estudiado la generación de ROS por un mecanismo alternativo NADPH oxidasa dependiente (González *et al.*, 2014) cuya deficiencia ocasiona la enfermedad granulomatosa crónica asociada a infecciones de herida y compromiso de la cicatrización.

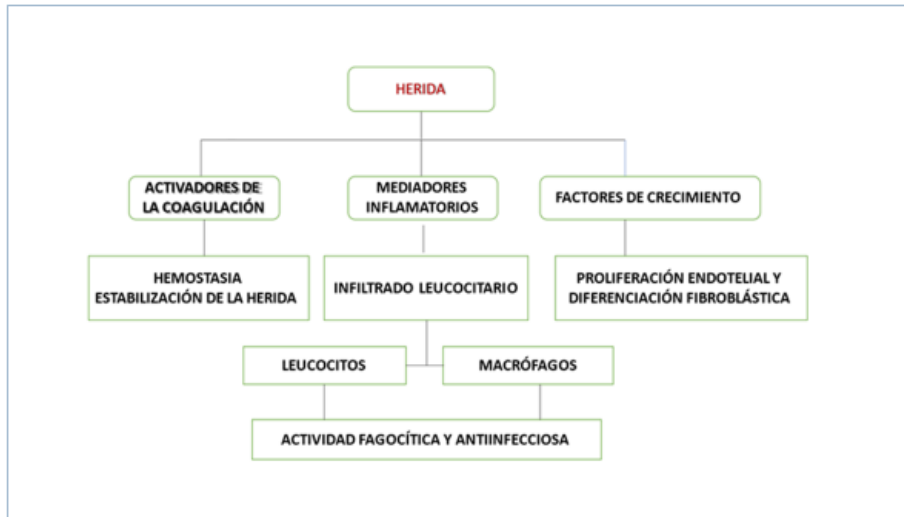
Localmente, los niveles altos de lactato y la hipoxia local activan la vía HIF1 incrementando la vascularización y estimulando una angiogénesis reparativa. El VEGF induce la proliferación de los fibroblastos facilitando la síntesis de colágeno y de matriz extracelular MEC formando un nuevo tejido de granulación que necesita madurar y remodelarse, consolidándose generalmente en los dos meses siguientes. VEGF también facilita su activación a fenotipo miofibroblástico que expresan los VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3 e igualmente promueve la transdiferenciación desde fibroblastos a células endoteliales y a miocardiocitos, (Yamakawa *et al.*, 2015).

En la cicatrización por primera intención con sutura directa en heridas limpias la reepitelización y la regeneración predominan sobre la fibrosis.

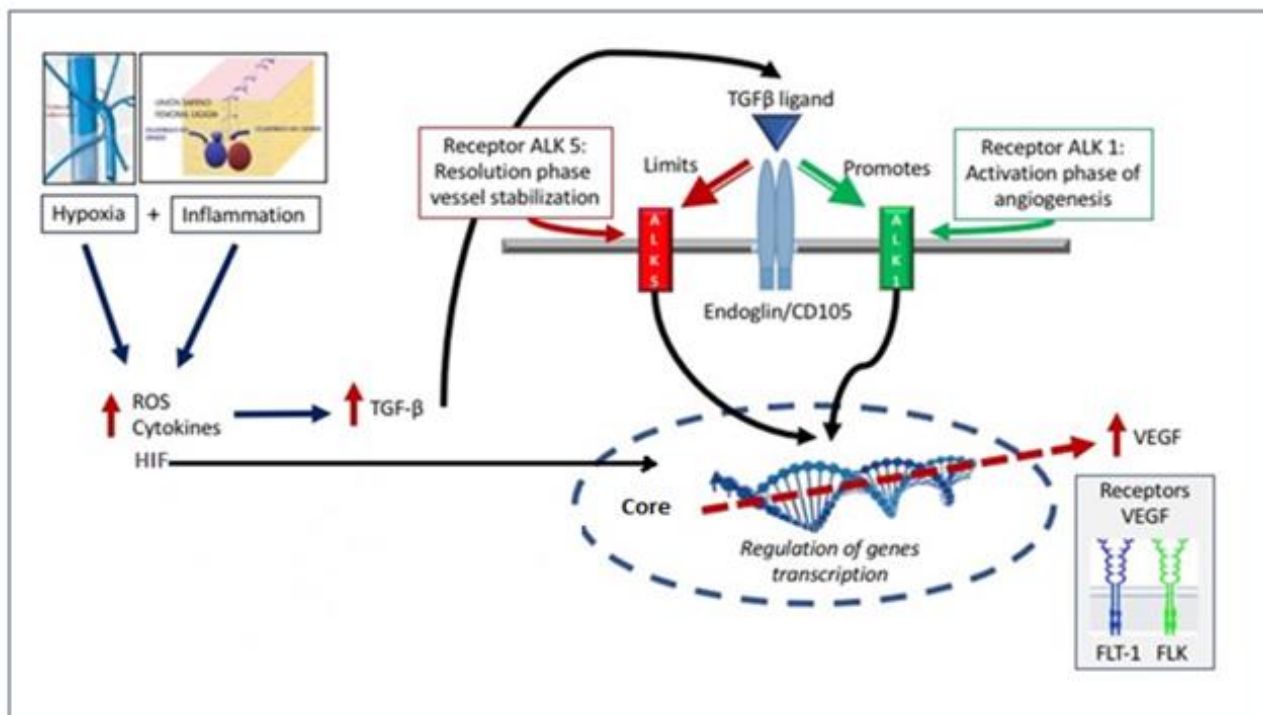
En este microclima dinámico otros numerosos mediadores químicos cooperan entre sí como el PDGF (en inglés *Platelet Derived Growth Factor*), el EGF (en inglés *Epidermic Growth Factor*) el FGF (en inglés *Fibroblastic Growth Factor*), TNF (en inglés *Tumoral Necrosis Factor*) y diferentes interleukinas. Así, la expresión de la endogлина que en el endotelio quiescente maduro normal es indetectable o en niveles bajos, se eleva durante la inflamación. Sus niveles se correlacionan con el infiltrado inflamatorio y la trans migración leucocitaria y el reclutamiento de los linfocitos T. En las heridas el aumento se ha observado, no solo en el endotelio sino también en los miofibroblastos de la herida desde el primer o segundo día con un pico de expresión entre el séptimo y décimo día coincidente con el pico de extravasación de los linfocitos y los niveles se mantuvieron en un nivel alto hasta los 28 días, cuando sus niveles comenzaron a caer permaneciendo indetectables en el tejido cicatricial (Torsney *et al.*, 2002).

La endogлина es uno de varios receptores de TGF $\beta$  inducidos durante la cicatrización de heridas y el incremento de su expresión puede tener importancia porque TGF $\beta$ 1 actúa como un poderoso inhibidor de la proliferación de células endoteliales *in vitro* (Muller *et al.*, 1987), mientras que los niveles elevados de endogлина contrarrestan estos efectos inhibidores del crecimiento y así permitir que las células endoteliales proliferen incluso en presencia de altas concentraciones de TGF que es liberado abundantemente por las plaquetas, los macrófagos y los leucocitos en el foco inflamatorio de la herida. Alternativamente, el TGF se ha correlacionado con un aumento de la síntesis de MEC en los fibroblastos. (Verrecchia y Mauviel, 2007). A partir de la tercera semana y prolongándose en los meses siguientes se produce la remodelación, con progresiva reducción del colágeno tipo III y sustitución por

colágeno tipo I para dotarla de resistencia tensil y simultáneamente se produce la contracción de la herida por los miofibroblatos.



**Figura 36.** Fisiopatología de la cicatrización.



**Figura 37.** Factores moleculares en la recurrencia varicosa inguinal. ROS: Especies Reactivas de Oxígeno; HIF-1y2, Factor inducible por hipoxia; TGF- $\beta$ , factor de crecimiento transformante beta; ALK 5 y 1 (receptores TGB- $\beta$ ) VEGF, Factor de Crecimiento Endotelial Vascular y sus receptores VEGFR- 1 y 2.





## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## I. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1 JUSTIFICACIÓN

La Insuficiencia Venosa Crónica (IVC) tiene una alta prevalencia en las sociedades occidentales. En sus estadios clínicos evolucionados, la IVC compromete de manera relevante la calidad de vida de los pacientes que la sufren y les supone importantes limitaciones físicas y emocionales. En el subgrupo de pacientes jóvenes es causa justificada de absentismo laboral prolongado, restringiendo por ello su vida laboral. A la repercusión social se le añade el impacto económico sobre el sistema sanitario.

La IVC ha sido considerada tradicionalmente como una enfermedad menor porque su relevancia clínica no se asocia a mortalidad, por lo que ha sido habitualmente relegada y, por ello, aún quedan interrogantes por aclarar, especialmente en el campo de la investigación básica. No se conoce con certeza su etiopatogenia ni existen marcadores que puedan predecir su evolución o su probabilidad de recurrencia.

Este estudio de biomarcadores intenta contribuir a un mejor conocimiento de este problema en su etiología y recurrencia.

### 2.2 HIPÓTESIS

En el estudio del mecanismo etiopatogénico de la IVC se ha analizado el papel de la hipoxia de la pared venosa como una de las variables en la presentación y progresión de la enfermedad varicosa. Asimismo, el desarrollo de las varices recurrentes por reaparición de un neocayado safenofemoral angiogénico, se produce en un entorno cicatricial donde la hipoxia y la inflamación locales, constituyen estímulos fundamentales en la cascada de señalización.

El conocimiento en biología molecular de la respuesta a la hipoxia y la responsabilidad de HIF y de VEGF y sus receptores en la secuencia angiogénica, han sido ampliamente estudiados en oncología, diseñando terapias antiangiogénicas inhibidores de esas moléculas. Sin embargo, su protagonismo en la etiopatogenia de la IVC y de manera especial en la recurrencia varicosa por un neocayado neoangiogénico no ha sido tan extensamente estudiado.

Endogлина es una proteína fundamental en la fisiología endotelial y actúa modulando la angiogénesis y la inflamación, junto con otras moléculas proangiogénicas o antiangiogénicas e inflamatorias, por lo que pudiera tener participación en la IVC.

Por todo ello, si determinados aspectos biomoleculares de la fisiopatología de la IVC permanecen desconocidos, y la angiogénesis está implicada en el desarrollo de varices y en especial en su recidiva, nos planteamos como hipótesis, que ciertas moléculas relacionadas con la angiogénesis y más concretamente endogлина como molécula menos estudiada., podrían estar involucradas tanto en el desarrollo de las varices esenciales como en su recidiva.

### 2.3 OBJETIVOS

#### 1. OBJETIVOS PRIMARIOS

1. Determinar los niveles en muestras de tejido biopsico de diferentes marcadores de angiogénesis HIF, VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2 y Endogлина en un subgrupo de pacientes sin enfermedad varicosa, en un segundo subgrupo de pacientes aquejados de varices esenciales y sometidos a safenectomía interna según la técnica standard y en un tercer subgrupo de pacientes con varices recidivadas por la presentación de un neocayado angiogénico.

2. Medir las concentraciones séricas en plasma de tales factores solubles angiogénicos de forma basal previamente a la intervención quirúrgica y a los tres meses de haber sido intervenidos.

#### 2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Analizar si cambios en la expresión de endogлина pudiesen estar relacionados con un mayor riesgo de desarrollo de la enfermedad varicosa primaria y si en las recurrencias por neocayados en la unión safenofemoral, endogлина pudiese estar relacionada con una angiogénesis excesiva o descontrolada.

2. Investigar si hay diferencias entre las concentraciones de factores angiogénicos en dependencia de la zona de tejido biopsiada de la proximidad del cayado de la unión safenofemoral y de las varices tronculares distales.

3. Estudiar si las determinaciones de los marcadores pueden presentar correlación con el grado evolutivo de expresión clínica de la enfermedad en general, y en particular si es enfermedad primaria o recurrente.

Si tales hipótesis fuesen correctas, plantear si el uso de fármacos que regulasen la expresión de endoglina pudiese estar indicado en la prevención de la recidiva en subgrupos de pacientes con un mayor riesgo.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**





### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

##### **RESPONSABILIDADES ÉTICAS**

Los pacientes participantes en el estudio son pacientes de la Unidad de Angiología y Cirugía Vascular del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca -CAUSA. Fueron operados por cirujanos de dicha Unidad entre marzo 2018 y octubre 2020. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación del Área de Salud de Salamanca que se ajusta a las normas éticas y de buena práctica clínica de la Asociación Médica mundial y de la Declaración de Helsinki. Código CEImPI 2019 03 204 aprobado el 1 /3/2019.

Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado para participar en el estudio y sus datos fueron tratados de forma confidencial y encriptada de acuerdo con lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal y la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica.

En cada paciente se obtuvo una muestra de suero previa a la intervención quirúrgica en el momento del ingreso y muestras de tejido durante la intervención quirúrgica (día 0). A los pacientes intervenidos por EVAR / TEVAR y en quienes obtuvieron muestras de venas sanas, los cuidados habituales fueron los correspondientes a la vigilancia de la herida y se les pautó profilaxis de ETEV y la antiagregación de rutina indicada en materiales protésicos. A los de pacientes intervenidos por varices primarias o recurrentes se les puso un vendaje compresivo durante aproximadamente siete días, hasta el momento de la retirada del material de sutura, y se les indicó de manera rutinaria profilaxis de ETEV con HBPM

Posteriormente, se realizó una segunda determinación de suero en la revisión de consultas, a los tres meses de la intervención quirúrgica según la pauta habitual de seguimiento clínico postoperatorio cuando las equimosis y hematomas postoperatorios, rutinarios en las intervenciones de varices habitualmente ya se han reabsorbido y desaparecido.

En el presente estudio se incluyeron inicialmente 63 pacientes, divididos en tres grupos. El grupo 1 de 18 pacientes sin varices, como control. El grupo 2 varices primarias o no recurrentes (n = 24) y el grupo 3 con varices recurrentes (n = 21) distribuidos por sexo y edad según se detalla en la tabla 3.

**Tabla 3.** Distribución por sexos y edades de los grupos.

Grupos	Pacientes	Sexo (M/W)*	Edad (años)
Control	18	17/1	58-84
Vena varicosa primaria	24	7/17	33-67
Vena varicosa recurrente	21	8/13	32-69

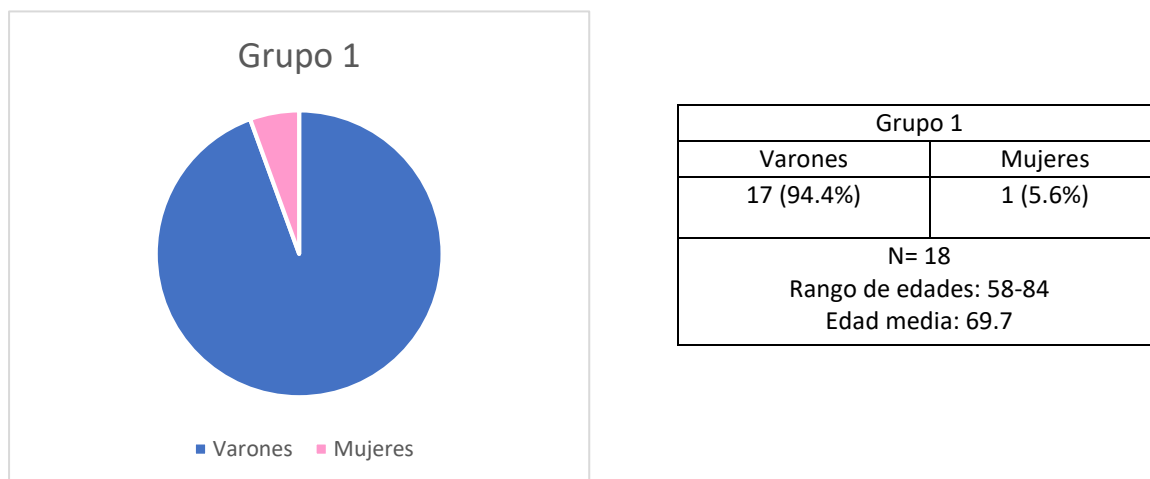
\* M (hombres); W (mujer).

### 3.1.1 GRUPO 1: GRUPO CONTROL

Integrado por 18 pacientes con diagnóstico de aneurisma de aorta, sin varices, ni signos de IVC, que fueron sometidos a intervenciones electivas de reparación endovascular de aneurisma (*EVAR, del inglés Endovascular Aneurysm Repair*) o de reparación endovascular de aorta torácica (*TEVAR, del inglés Thoracic Endovascular Aortic Repair*). En este grupo se obtuvieron muestras mediante biopsias incisionales procedentes de las colaterales venosas del cayado, venas pudendas o venas epigástricas, durante el abordaje femoral para el procedimiento endovascular.

La interpretación de los datos ha de limitarse en este grupo control de pacientes pues la edad de diagnóstico de los aneurismas es significativamente mayor, predominando mayoritariamente en hombres. Además, este grupo de pacientes por sus comorbilidades asociadas presentan una valoración preanestésica ASA más elevada y postoperatoriamente son antiagregados indefinidamente.

Tras evaluar dichos sesgos el grupo I fue desestimado como grupo control, realizando las comparaciones relativas entre ambos grupos de pacientes aquejados de enfermedad varicosa tanto primaria en el grupo 2 o PVV (en inglés *Primary Varicose Veins*), como recidivada en el grupo 3 o RVV (en inglés *Recurrent Varicose Veins*).

**Tabla 4.** Epidemiología grupo 1

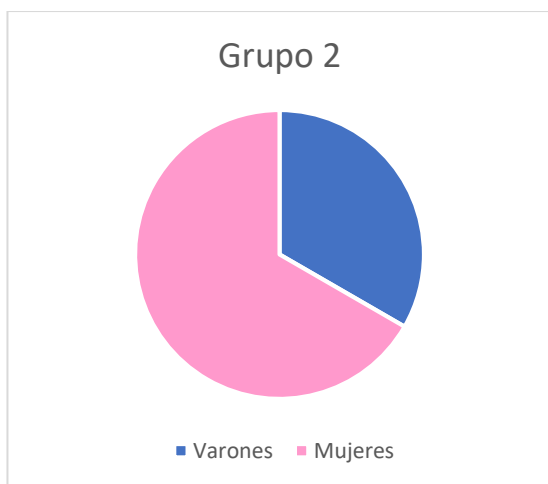
### **3.1.2 GRUPO 2: PACIENTES CON VARICES PRIMARIAS**

Criterios de inclusión: 24 pacientes diagnosticados de varices esenciales por insuficiencia de la unión safeno-femoral con grados CEAP C2-6, ASA I-II, y con reflujo detectados mediante ecodoppler de más de 0.5 seg de duración (Labropoulos et al, 2003).

Criterios de exclusión: varices posttrombóticas y congénitas CEAP C0-1; varices no tronculares. Índice de masa corporal o IMC >30 y ASA III (en inglés *American Society of Anesthesiology*). La presencia de hallazgos patológicos en el sistema venoso profundo fue considerada un criterio de exclusión. Igualmente, el embarazo y parto en el último año, y la coexistencia de enfermedades inflamatorias y tumorales activas.

Fueron intervenidos practicando desconexión safenofemoral, *stripping* de safena interna y resección de colaterales. Se obtuvo una doble biopsia. Una muestra de vena safena interna en la inmediata proximidad de la unión safenofemoral de más de un cm de longitud y una segunda muestra de varices R3 del muslo o la pierna.

**Tabla 5.** Epidemiología grupo 2



Grupo 2	
Varones	Mujeres
8 (33.3%)	16 (66.6%)
N= 24 Rango de edades: 33-67 Edad media: 50.8	

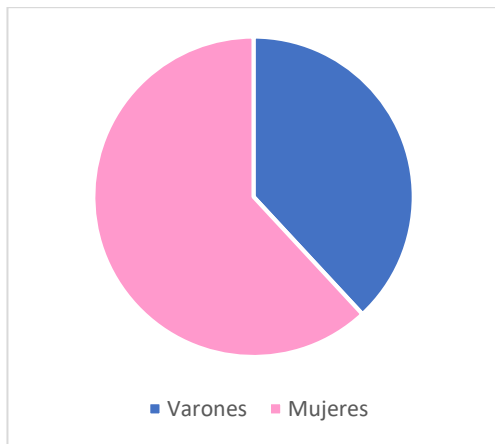
### **3.1.3 GRUPO 3: PACIENTES CON VARICES RECIDIVADAS**

Inicialmente se reclutaron 24 pacientes de los que 2 se perdieron en el procesamiento y uno en el seguimiento. Los criterios clínicos de inclusión y exclusión se definieron al igual que para el grupo 2, reclutando pacientes diagnosticados como recidivas inguinales desde la unión safenofemoral, que en el ecodoppler preoperatorio presentasen imágenes sugestivas de neocayado neoangiogénico con reflujo igualmente prolongado diagnosticado mediante eco-doppler. Fueron sometidos a reintervención quirúrgica obteniendo igualmente dos muestras biópsicas. Una primera muestra del neocayado reseca de la unión safenofemoral y una segunda de varices R3 del muslo o pierna.

Determinar las fechas de la intervención previa resultó infructuoso. Un número alto de pacientes habían sido operados por vez primera en otros centros, sin tener disponibilidad de informes de las intervenciones previas. En la anamnesis la precisión de las fechas fue igualmente errática pues los pacientes en su mayor parte consideraban la intervención previa como una cirugía menor sin que conservasen los informes de las mismas. En ningún caso se intervinieron pacientes que hubiesen sido intervenidos en los 5 últimos años previos.

Como en el grupo previo durante el postoperatorio a los pacientes se les indicó analgesia a demanda, heparina de bajo peso molecular postoperatoriamente hasta la retirada del vendaje compresivo al 7º día y se les indicó terapia compresiva con media de presoterapia durante tres meses.

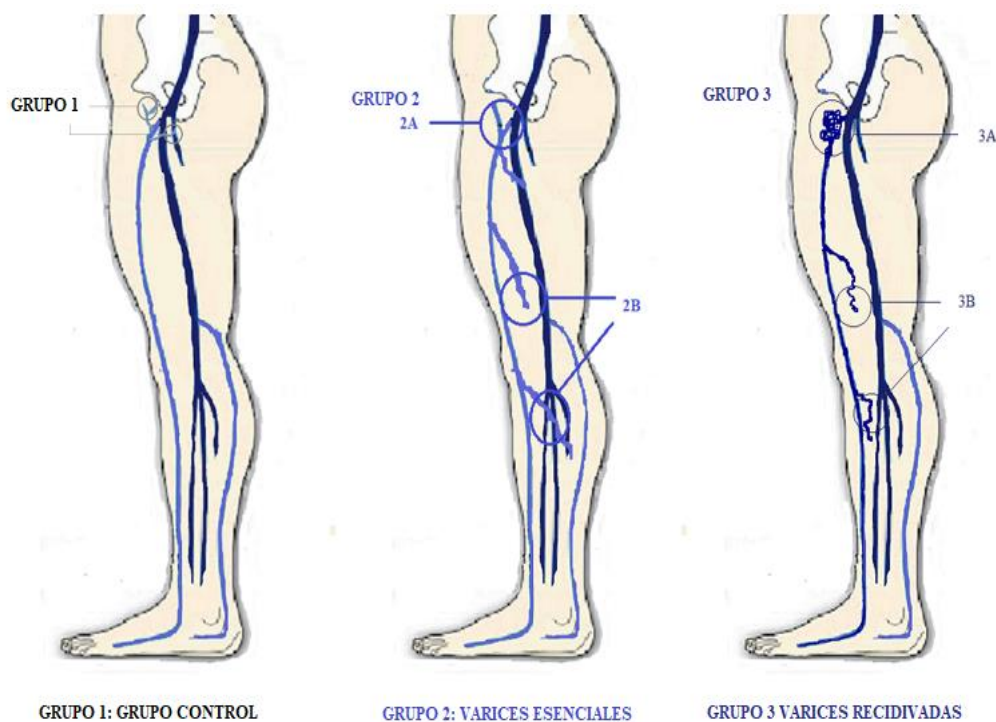
**Tabla 6.** Epidemiología grupo 3



Grupo 3	
Varones	Mujeres
8 (38%)	13 (62%)
N= 21 Rango de edades: 32-69 Edad media: 51.6	

**Tabla 7.** Distribución grupos por sexo y edades





**Figura 38.** Muestras de tejido. El grupo 1 control, biopsias de venas colaterales del cayado safeno. El grupo 2, muestras de varices primarias: 2A biopsias del cayado safeno-femoral; 2B, R3 de safena interna distales. El grupo 3, recidivas: las 3A biopsias del neocayado; las 3B biopsias de varices tronculares de ese territorio.

### 3.2 METODOLOGÍA Y PROCESAMIENTO DE LAS BIOPSIAS

Las biopsias fueron inmediatamente conservadas mediante congelación en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaron anonimizadas en un congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su procesamiento posterior.

Las muestras se clasificaron en los grupos 1 o control, 2 venas varicosas primarias (PVV) y 3 venas recidivadas (RVV). A su vez, dentro de los grupos 2 y 3 se definieron el subgrupo A y B, en relación con la posición proximal (A) o distal (B) del fragmento venoso a la unión safeno-femoral (Figura 38).

### 3.2.1 ANÁLISIS DEL TEJIDO POR PCR A TIEMPO REAL o qPCR

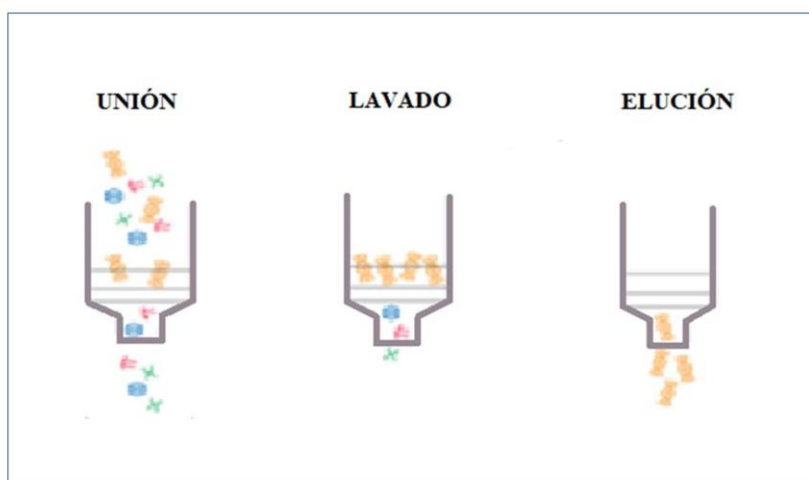
Para analizar la expresión de los genes de interés en las muestras biópsicas, es necesario un procesamiento que permita obtener su RNA que utilizado como molde es convertido mediante retrotranscripción en DNA complementario o cDNA, para después realizar las qPCR (en inglés *quantitative Polymerase Chain Reaction*) a partir de ese cDNA.

#### EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL RNA

Para conseguir el RNA del citoplasma celular se parte de muestras de tejido pulverizado. Las muestras biópsicas criogenizadas se disgregan mediante percusión repetida hasta conseguir muestras de tejidos pulverizados. El procedimiento se realiza en hielo seco para evitar la descongelación del tejido y la degradación del RNA.

El tejido pulverizado se recoge en un tubo de microcentrifugación Eppendorf y se almacena en congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su procesamiento posterior.

Para la extracción del RNA, se realiza el pesado de 20 mg del tejido pulverizado en la balanza analítica. Se utiliza el kit de extracción comercial NucleoSpin<sup>®</sup> RNA (Macherey-Nagel), siguiendo las especificaciones del fabricante basadas en la separación de ácidos nucleicos por adsorción en una columna y la posterior elución del RNA con agua libre de nucleasas en un volumen final de 60  $\mu\text{l}$ .



**Figura 39.** Método de purificación para la obtención de RNA en columna.

Tras su extracción, el RNA se cuantifica en un espectrofotómetro Nanodrop 1000 V3.2.1 (Thermo Fisher Scientific). Las muestras se congelan a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento siguiente.

### **RETROTRANSCRIPCIÓN**

La retrotranscripción permite la obtención de DNA complementario (cDNA) a partir de RNA molde mediante la actividad enzimática de la transcriptasa reversa o retrotranscriptasa. Es una DNA polimerasa que tiene como función sintetizar DNA utilizando como molde el RNA monocatenario. Se utiliza el kit comercial iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (Bio-Rad).

La síntesis se lleva a cabo en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ , diluyendo 250 ng de RNA de cada muestra en un volumen de 16  $\mu\text{l}$  de agua ultrapura libre de nucleasas, añadiendo después 4  $\mu\text{l}$  de iScript™ Reverse Transcription Supermix (BioRad) 5X, que incluye los reactivos necesarios para la reacción. Se incuban las muestras en el termociclador MyCycler™ (Bio-Rad) a  $25^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos, seguidos de 30 minutos a  $42^{\circ}\text{C}$  y 5 minutos finales a  $85^{\circ}\text{C}$ . El DNA obtenido o cDNA, monocatenario, se almacena a  $-20^{\circ}\text{C}$  de temperatura para su procesamiento posterior.

### **PCR CUANTITATIVA: qPCR o PCR A TIEMPO REAL**

La PCR cuantitativa, qPCR o PCR a tiempo real, posibilita sintetizar grandes cantidades del cDNA específico para una muestra, mediante la actividad enzimática de la DNA polimerasa. Permite amplificar de manera selectiva el número de copias de esa secuencia específica de cDNA o amplicones, de manera exponencial, igual a  $2^n$  siendo n el número de ciclos. A diferencia de la PCR convencional desarrollada por Kary Mullis en 1985 (premio Nobel Química 1995), es una prueba simultánea de amplificación y detección lo que supone un menor tiempo de espera.

Cada ciclo de qPCR cuenta con una primera fase de desnaturalización en la que las cadenas de DNA son separadas por calentamiento al romperse los puentes de hidrógeno entre las dos hebras de DNA. Se continúa en una segunda fase con el anillamiento o annealing de los cebadores, también llamados iniciadores o Primers en las cadenas molde. Los Primers son secuencias cortas de DNA (oligonucleótidos) que son complementarios a cada uno de los extremos y delimitan la región de interés que queremos amplificar. Finalmente, a través de la elongación del Primer, por la acción de una DNA



polimerasa que adiciona los nucleótidos complementarios a la cadena molde se obtiene la síntesis de la cadena.

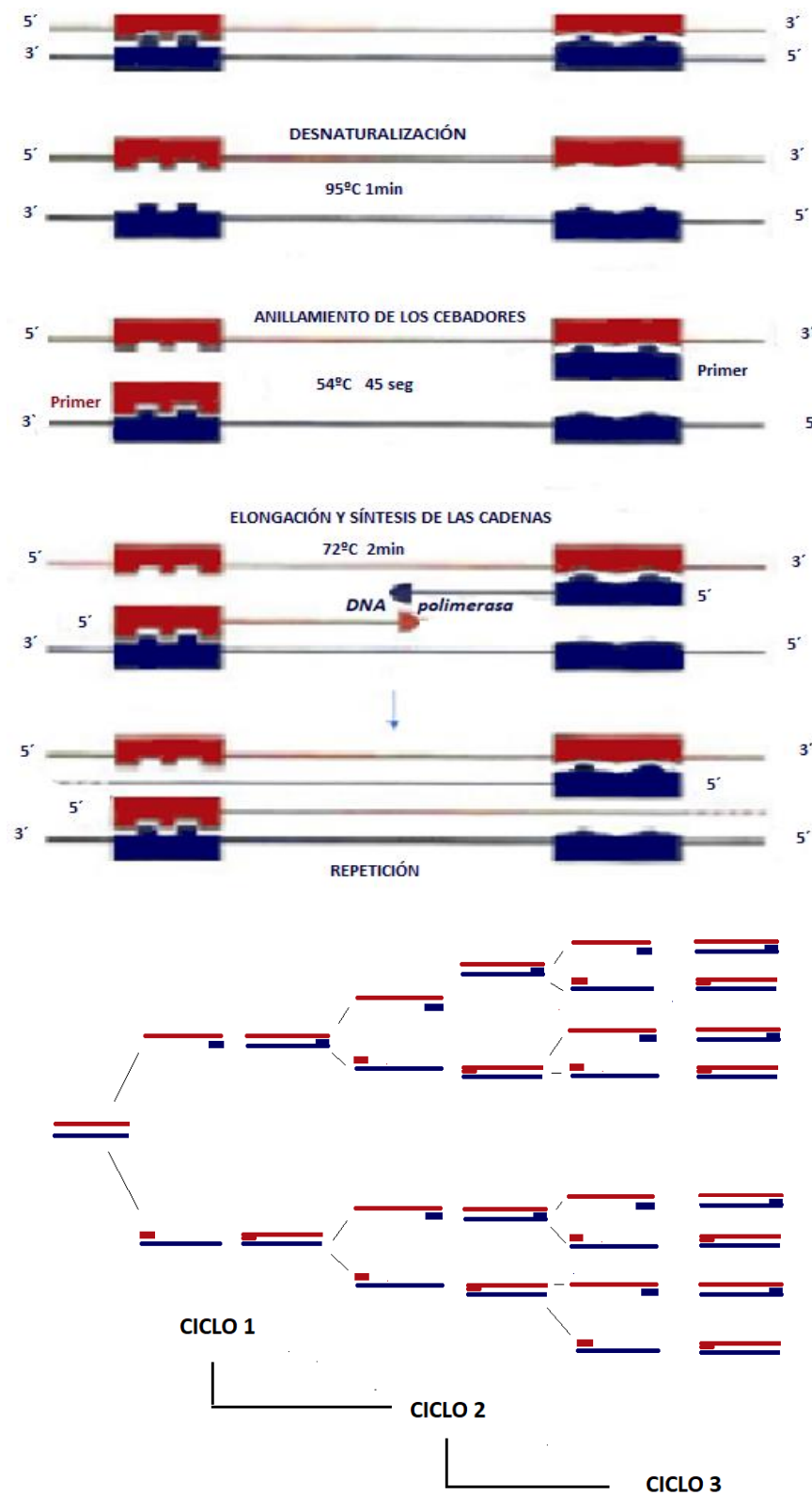


Figura 40. qPCR y ciclos de amplificación.

La qPCR combina un termociclador que controla ciclos de temperaturas específicas programables y una cámara para medir fluorescencia. El termociclador efectúa la qPCR en muestras utilizando una sonda, fluorocromo fluorescente o fluoróforo que se une al DNA liberando fluorescencia. La emisión fluorescente, proporcional a la cantidad de DNA amplificada en cada ciclo, es enviada al espectrofotómetro para el análisis de las diferentes longitudes de onda, pudiéndose así cuantificar la expresión del biomarcador analizado. La gráfica de qPCR se interpreta registrando la fluorescencia con respecto al ciclo de ensayo comparando la fluorescencia entre las muestras analizadas para un biomarcador y entre biomarcadores diferentes.

La mezcla para la reacción de PCR se prepara sobre un volumen final de 20 µl, en las siguientes proporciones: 1µL de cDNA, 8,2 µl de agua mili-Q, 10 µl de iQTM SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) y 0,4 µl de cada cebador o primer (forward y reverse) a una concentración de 20 pmol/µl. Para simplificar la puesta a punto de las qPCR, se emplearán primers comerciales de la marca BioRad, validados para condiciones de laboratorio. De esta mezcla, se pipetea 19 µL en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Las muestras se cargan por triplicado y se utiliza agua mili-Q como control negativo. La placa se introduce en el termociclador iQTM 5, y se inicia la qPCR.

Para normalizar los datos de expresión génica, se utilizará para el control interno un gen constitutivo o *housekeeper*. Es una secuencia de DNA diferente al gen diana objeto de estudio. El *housekeeper* siempre ha de amplificarse, por lo que así confirma la validez de las muestras negativas, detectando inhibiciones en la amplificación y falsos negativos. Para este control de la amplificación utilizamos como housekeeper la GAPDH (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa).

Gen objetivo	Referencia
VEGF-A	qHsaCED0006937
VEGFR-1	qHsaCID0010190
VEGFR-2	qHsaCID0006310
HIF-1	qHsaCID0014755
ENG	qHsaCID0010800
DLL4	qHsaCID0008450
TGF-β	qHsaCID0017026
MMP-2	qHsaCID0015623
MMP-9	qHsaCID0011597
TIMP-1	qHsaCID0007434



**Figuras 41 y 42.** Primers comerciales utilizados y curva de amplificación de la qPCR.

### 3.3 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SANGRE

Se obtuvieron dos muestras de sangre periférica en un tubo seco libre de anticoagulantes, de aditivos o geles (Vacuette Tube referencia 455010). La primera muestra, preoperatoria (día 0) y una segunda correspondiente al seguimiento tres meses después en el momento en que el paciente acudía a la consulta de revisión. Las muestras de sangre, igualmente anonimizadas, se centrifugaron posteriormente para obtener el suero dividiéndose en alícuotas y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  en el Biobanco del IBSAL, según lo dispuesto por el Real Decreto 1716/2011 de Biobancos.

#### 3.3.1 ANÁLISIS LUMINEX DE BIOMARCADORES EN SUERO

Para el procesamiento de las muestras de suero correspondientes al día 0 y al seguimiento al trimestre, se eligió el ensayo de inmunodetección multiplexada fluorométrico *MFIA* (en inglés *Multiplexed fluorometric ImmunoAssay*) o tecnología Luminex (Wunderlich *et al.*, 2011; Cook *et al.*, 2019). Es una técnica basada en microesferas magnéticas o beads de unos 5.6 micrometros, compuestas de poliestireno que posibilitan la detección simultánea de varios analitos en una única muestra. Este proceso es una variante del ensayo ELISA (en inglés *Enzyme linked immunoabsorbent assay*), en concreto del ELISA tipo sándwich (ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos).

El ELISA o ensayo de inmuoabsorción ligado a enzimas ha sido el principal método de screening diagnóstico en suero. Es un singleplex en que se detecta un único resultado por pocillo.

En el inmunoensayo multiplexado *MFIA* (*Charles River Laboratories International Inc Multiplexed fluorometric ImmunoAssay*) las reacciones se desarrollan en un modo similar al ELISA ofreciendo similares sensibilidades y especificidades con un procesamiento más simple reduciéndose las cantidades de suero, reactivos y materiales desechables necesarios en el procesamiento e incorpora controles internos para verificar la idoneidad del sistema y asegurar la exactitud de los resultados. Su ventaja sobre el ELISA es que permite testar múltiples biomarcadores simultáneamente en una única muestra.

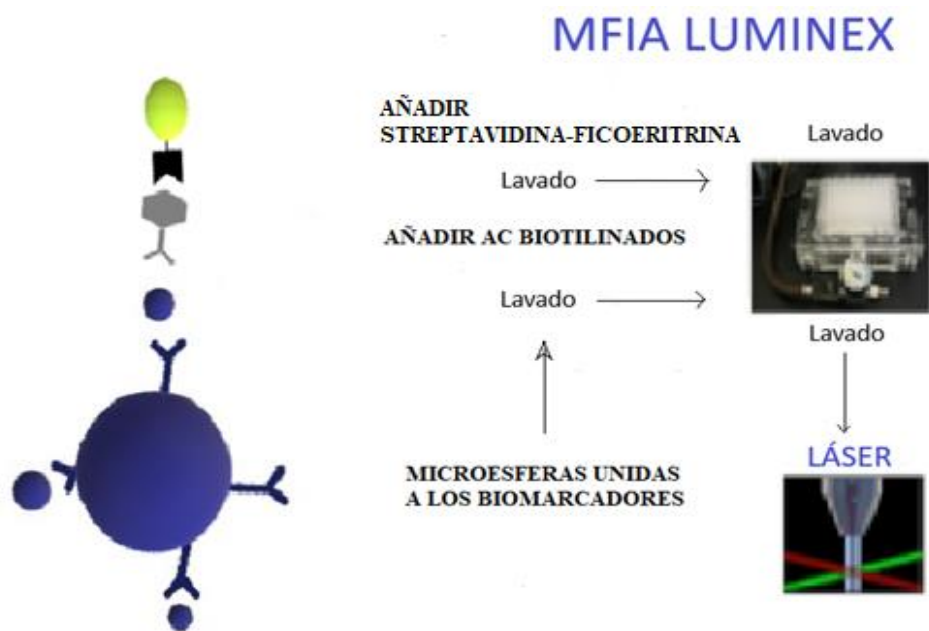
Los ensayos *MFIA* se realizan a temperatura ambiente  $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y son sensibles a la luz por lo que una exposición prolongada puede producir blanqueamiento impidiendo su lectura.

Una característica importante de las microesferas es su capacidad para absorber contrastes pudiendo impregnarse de fluoróforos, y permitiendo identificar cada microesfera por su concentración única de contraste. Las superficies de las microesferas están cubiertas con grupos carboxilo que reaccionan precubriéndolas con anticuerpos específicos inmovilizados contra los analitos objetos del estudio.

De esta forma, se establece un código color-anticuerpo y cada subpoblación de microesferas de un mismo color reconoce un único antígeno. Posteriormente, se añade un anticuerpo secundario de detección que se une al analito. Finalmente, el analizador combina las señales de las microesferas y del anticuerpo secundario para determinar el analito y su concentración, respectivamente. Es una tecnología analítica especialmente interesante para la detección de patrones de biomarcadores específicos. (Tighe *et al*, 2013).

Se utilizaron 2 paneles del ensayo Human Magnetic Luminex® Assay (R&D Systems), seleccionados previamente en los kits que ofrece la marca comercial. El primero, incluyó la detección de endoglina, VEGFR-1 y VEGFR-2; el segundo, VEGF. Las muestras que contenían los antígenos y las micropartículas que contenían los anticuerpos inmovilizados, se pipetearon en los pocillos. Los anticuerpos se unieron a los analitos de interés. Se realizó un primer lavado para eliminar las sustancias no unidas y posteriormente se añadió a cada pocillo un cóctel de anticuerpos secundarios biotinilados específicos para cada analito. Se realizó un segundo lavado para eliminar los anticuerpos biotinilados excedentes no unidos, y a continuación se añadió el conjugado de estreptavidina-ficoeritrina, que se unió al anticuerpo biotinilado. Para finalizar, se realizó un nuevo último lavado que eliminó la estreptavidina-ficoeritrina igualmente excedente no unida.

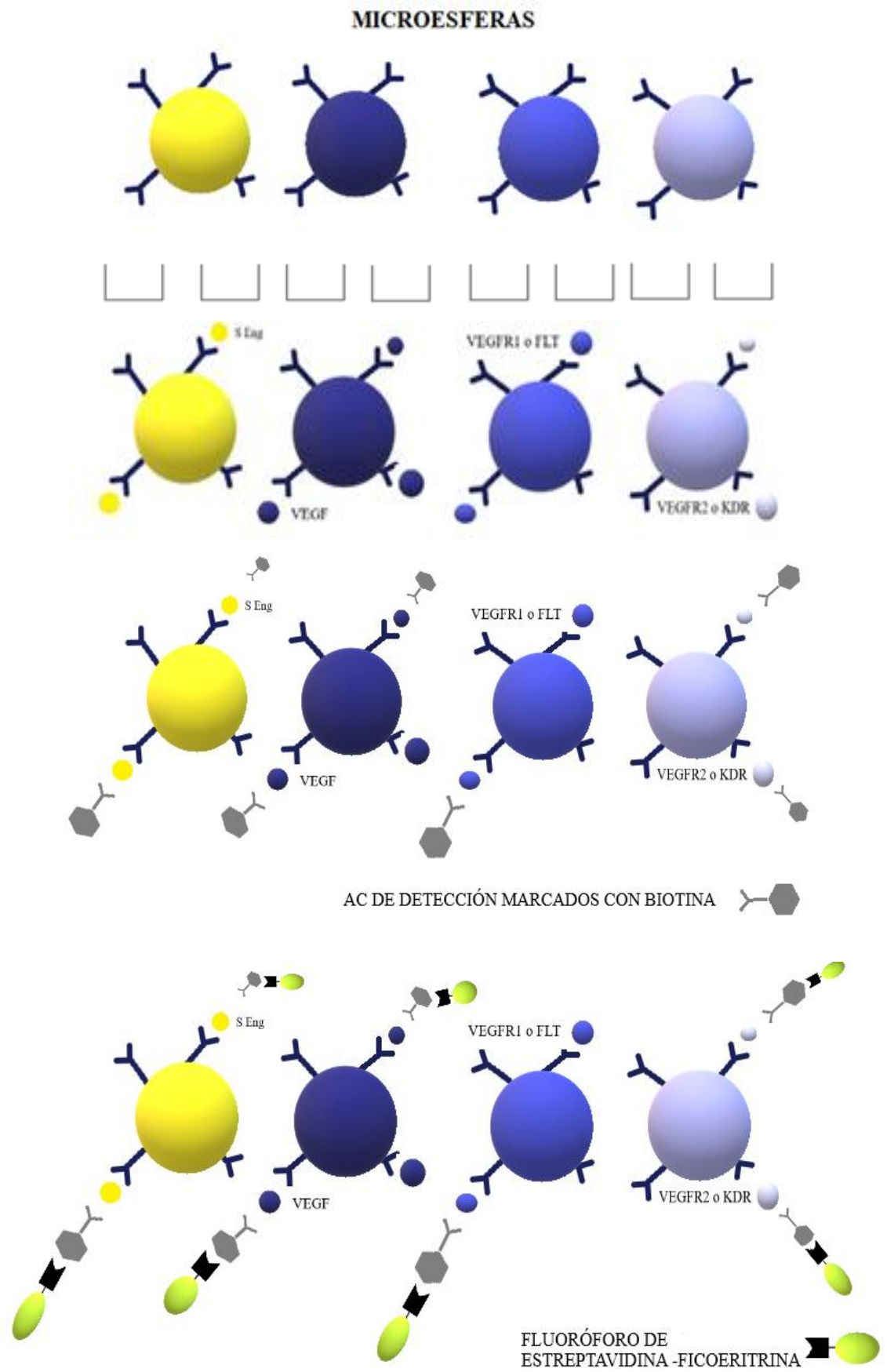
El material así obtenido con las microesferas, se procesó con un analizador Luminex específico de esta tecnología perteneciente al Servicio de Hematología-CAUSA. Es una citometría de flujo modificada en la que cada microesfera es escaneada por un fluorómetro laser dual. Un láser rojo de 620 nm excita el contraste interno de las microesferas y al identificarlas se corresponden a una determinación de su biomarcador. El verde de 535 nm analiza la intensidad de la fluorescencia del colorante indicador de esta reacción, la ficoeritrina, determinando la cantidad de biomarcador unida a la micropartícula.



**Figura 43.** Microesferas codificadas por color unidas covalentemente a los analitos. Las reacciones se cuantifican por la fluorescencia de la ficoeritrina (*Charles River Laboratories International Inc Multiplexed fluorometric ImmunoAssay MFIA*).



**Figura 44.** Fases del ensayo de inmunodetección multiplexada fluorométrico MFIA



**Figura 44.** Fases del ensayo de inmunodetección multiplexada fluorométrico MFA.

### 3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de los valores de expresión relativa de los biomarcadores, obtenidos por qPCR de las muestras de los tejidos se representan en diagramas de caja (en inglés *box-plot*) que muestran la mediana y los percentiles 25 a 75, con bigotes o *whiskers* que muestran los percentiles 10 a 90. Previamente, estos datos se normalizaron realizando una transformación logarítmica del valor de expresión relativa obtenido, lo que permitió transformar la distribución de los datos en una distribución normal. Además, y para simplificar la comprensión, se transformaron a tanto por ciento con respecto a la muestra del grupo de varices primarias y se representan en un formato de tabla incluyendo la media, la desviación típica SD (en inglés *standard deviation*) y error standard de la media SEM (en inglés *standard error of the mean*), así como el nivel de significación (p-valor), obtenido mediante el análisis de las muestras normalizadas.

Para las determinaciones de moléculas solubles analizadas en la sangre, los datos se presentan en gráficos de columnas como media + SEM en pg/ ml. Adicionalmente las tablas incluyen la media, la desviación típica y el error standard de la media, junto con el p-valor

Se utilizaron pruebas t para el análisis entre grupos y ANOVA para las comparaciones entre los CEAP. Se aplicó la prueba de normalidad de D'Agostino-Pearson a los conjuntos de datos antes de las comparaciones estadísticas

El valor de p obtenido tras el análisis t test supone un resultado estadístico significativo a partir de 0,05 y se representa con uno, dos o tres asteriscos directamente proporcionales al grado de significación  $\alpha$  (0.05, 0.01, 0.001)\*. Todos los análisis y gráficos se realizaron con GraphPad Prism versión 7.0.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU., [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).





## **RESULTADOS**



## IV. RESULTADOS

### 4.1. EXPRESIÓN DE BIOMARCADORES EN BIOPSIA DE PARED VENOSA

En el análisis definitivo de resultado, tras haber sido desestimados los pacientes correspondientes al grupo 1, incluimos 24 pacientes del grupo 2 correspondiente a varices primarias (PVV) y 21 pacientes del grupo 3 varices con recidiva inguinal (RVV).

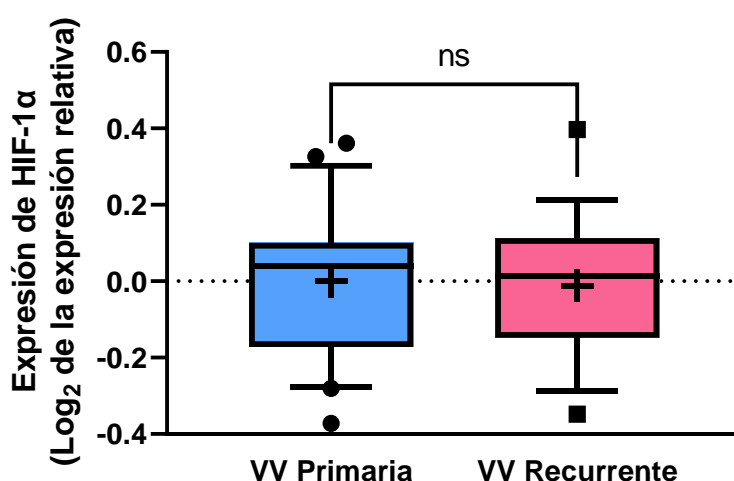
**Tabla 8.** Características de los grupos 2 (PVV) y 3 (RVV)

Grupos	Pacientes	Sexo (M/W)*	Edad (años)
Vena varicosa primaria PVV	24	7/17	33-67
Vena varicosa recurrente RVV	21	8/13	32-69

\* M (hombres); W (mujer).

#### 4.1.1 EXPRESIÓN DE BIOMARCADORES EN BIOPSIAS DE LA UNIÓN SAFENOFEMORAL

En primer lugar analizamos la expresión de los biomarcadores en las biopsias de la unión safenofemoral, el lugar donde se produce la unión por neoangiogénesis en el grupo de varices recurrentes.



**Figura 45.** Expresión proximal del factor inducible por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ).

El análisis de la expresión mediante qPCR del factor inducible por hipoxia (HIF-1A) no demostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de varices primarias (PVV) y varices recidivadas (RVV).

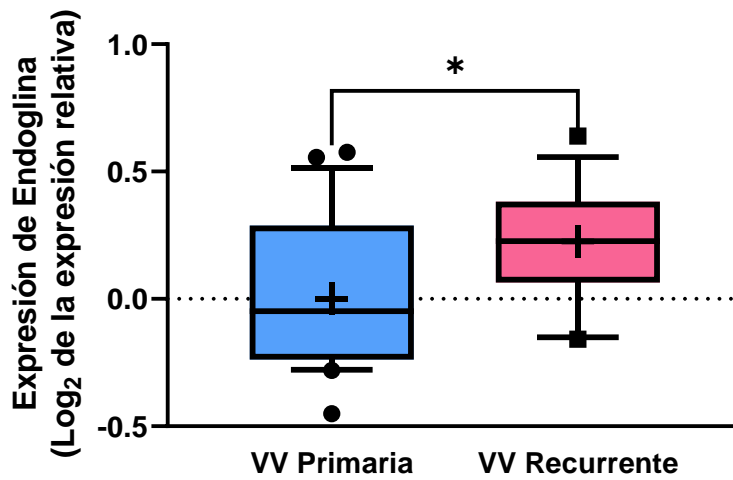


Figura 46. Expresión proximal de Endoglin tisular.

El segundo biomarcador que se estudió mediante qPCR fue la Endoglin tisular. En este caso, el grupo con varices recidivadas (RVV) evidenció una mayor expresión de Endoglin que el grupo 2 correspondiente a las varices primarias (PVV), siendo este aumento estadísticamente significativo ( $p=0.0104$ ),

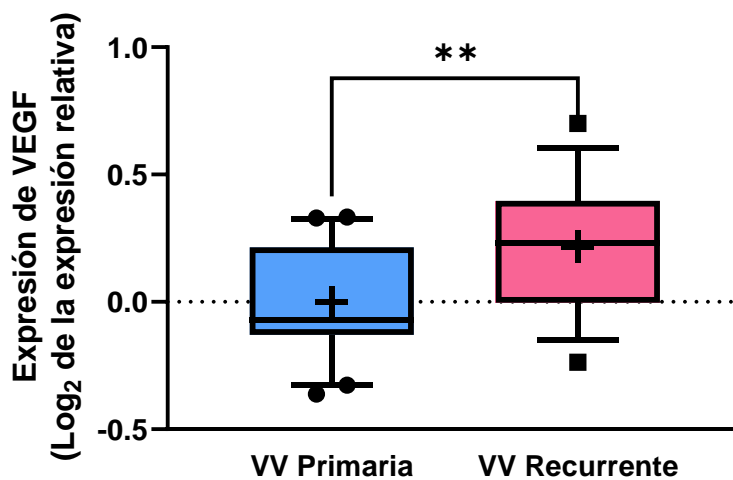
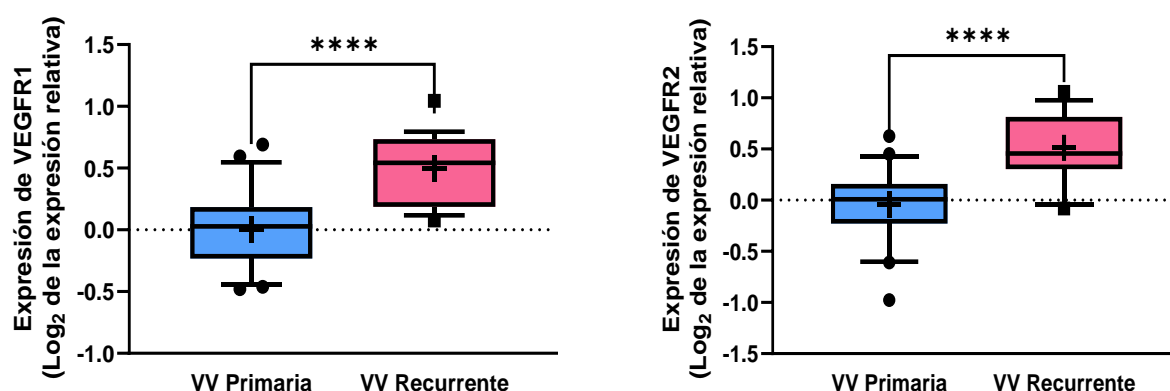


Figura 47. Expresión proximal de factor de VEGF-A.

El tercer biomarcador analizado fue el factor de crecimiento vascular endotelial A (VEGF-A). Como para Endogлина, las determinaciones fueron significativamente mayores ( $p=0.0074$ ) en el grupo de pacientes con varices recidivadas (RVV) que en el grupo correspondientes a varices esenciales o primarias (PVV)..



**Figura 48.** Expresión proximal de los receptores (VEGFR-1 y VEGFR-2).

Como para el análisis mediante qPCR de VEGF-A, los resultados para ambos receptores de VEGF: VEGFR-1 y VEGFR-2 también mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p<0.0001$ ) entre ambos grupos, con una sobreexpresión de ambos biomarcadores en el grupo de recurrencias (RVV) respecto a los datos obtenidos por qPCR en el grupo de varices primarias (PVV).

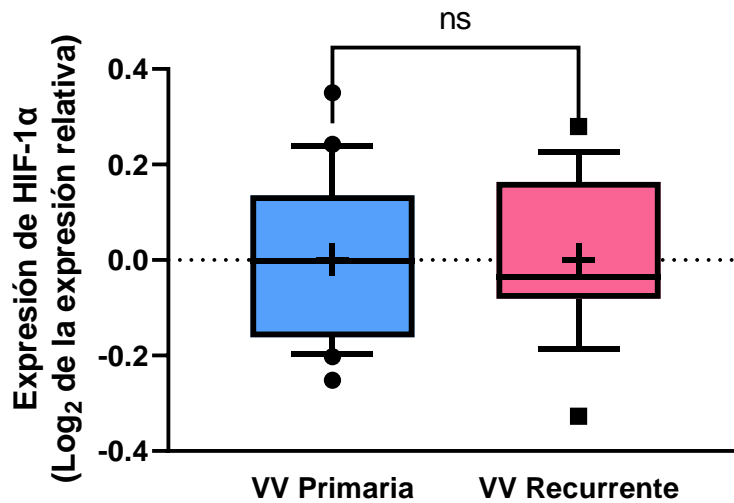
En la tabla 9 se pueden observar los datos de media, desviación standard (SD) y error de standard de la media (SEM) de cada uno de los genes analizados en los 2 grupos de interés. Además, se indica el nivel de significación para cada comparación.

**Tabla 9.** Biomarcadores y resultados estadísticos de las determinaciones proximales.

Genes analizados	Vena Varicosa Primaria			Vena Varicosa Recurrente			p-valor
	Media	SD	SEM	Media	SD	SEM	
HIF1A	100	44,14	9,63	96,47	42,85	9,83	n.s.
ENG	100	77,65	16,94	148,1	73,54	16,87	*
VEGF-A	100	50,13	10,94	171,2	101,5	23,28	**
VEGFR1	100	88,50	19,31	283,8	181,9	41,72	****
VEGFR-2	100	80,37	17,54	340,2	249,4	57,21	****

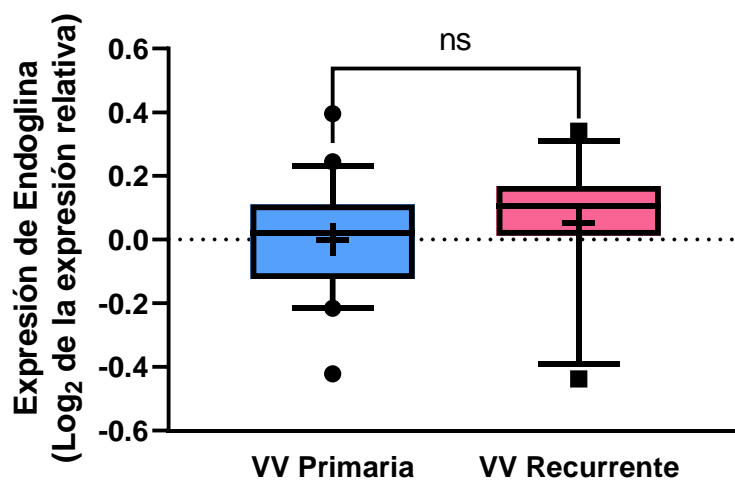
**4.1.2 EXPRESIÓN DE BIOMARCADORES EN MUESTRAS DISTALES**

Con el objetivo de analizar si las alteraciones observadas en las biopsias de la unión safenofemoral se debían a cambios locales de en la región biopsiada o a alteraciones del paciente de origen sistémico, analizamos la expresión de los genes en biopsias venosas recogidas de una región distal a la unión safenofemoral.



**Figura 49.** Expresión distal del factor inducible por hipoxia (HIF-1α).

El análisis de la expresión mediante qPCR del factor inducible por hipoxia (HIF-1α) en ambos grupos no demostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos cuando las muestras biopsiadas se obtuvieron de varices R3 distantes de la unión safenofemoral, intacta en el grupo 2 de varices primarias (PVV) y reintervenidas en grupo 3 (RVV).



**Figura 50.** Expresión distal de Endoglina.

De manera análoga, la expresión de Endoglina mediante qPCR en las muestras de varices distales a la unión safeno-femoral no demostró diferencias entre los dos grupos.

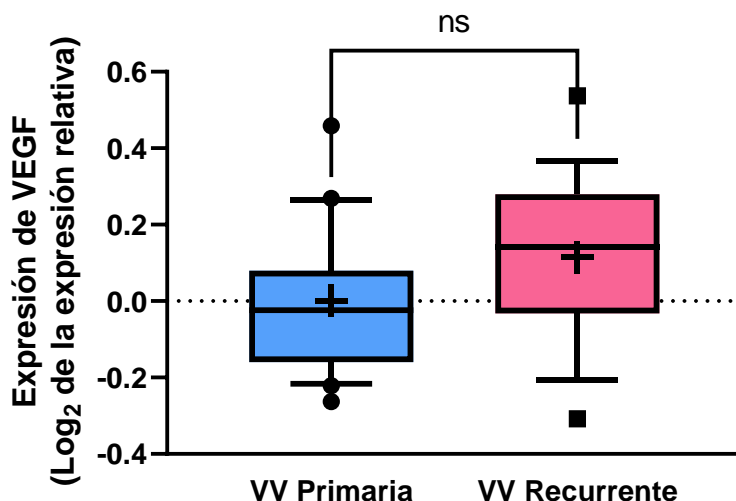


Figura 51. Expresión distal de factor de crecimiento vascular endotelial A (VEGF-A).

Como en las determinaciones de HIF-1 $\alpha$  y Endoglina tisular, para VEGF-A tampoco se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos comparados.

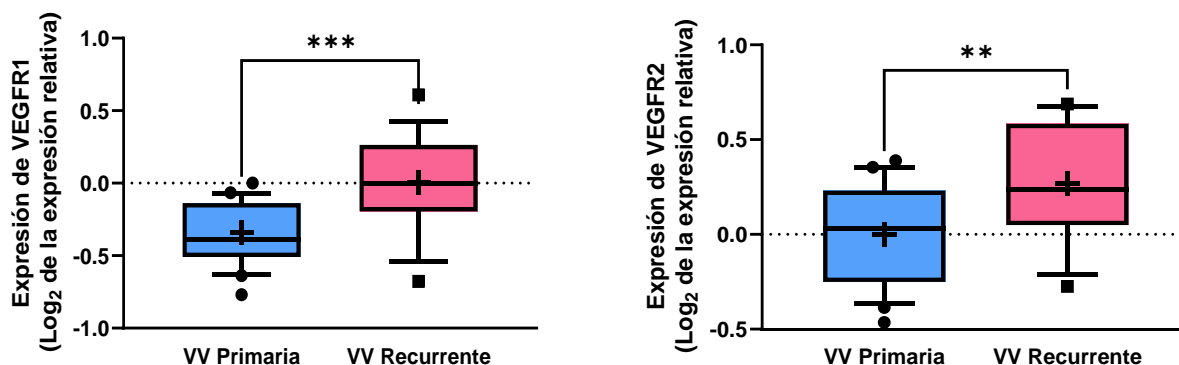


Figura 52. Expresiones distales de VEGFR-1 y VEGFR-2.

En los resultados de las muestras distales, la expresión de VEGFR-1 y VEGFR-2 mostró diferencias significativas siendo también más elevadas en el grupo de varices recidivadas que en el grupo de varices primarias, resultados que ya se evidenciaron en las muestras de tejido proximal descritas con anterioridad.

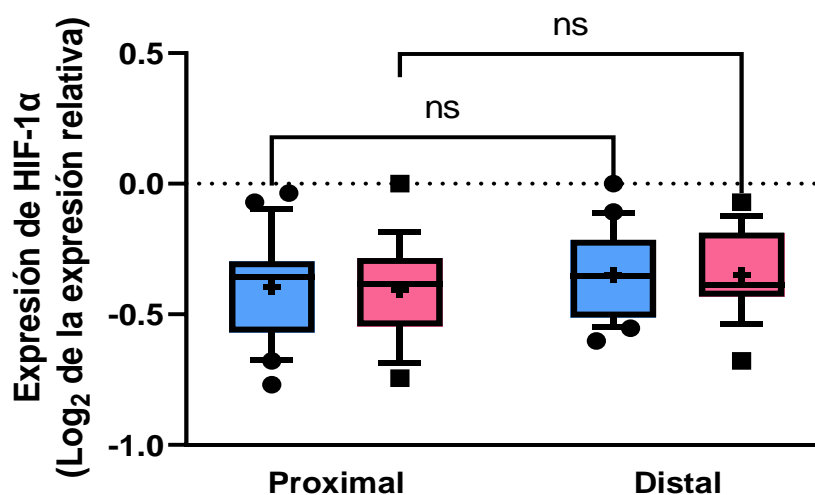
En la tabla 10 se detallan los datos de media, desviación standard (SD) y error de standard de la media (SEM) de cada uno de los genes analizados distalmente en ambos grupos, indicando el nivel de significación para cada comparación.

**Tabla 10.** Biomarcadores y resultados estadísticos de las determinaciones distales

Genes analizados	Vena Varicosa Primaria			Vena Varicosa Recurrente			p-valor
	Media	SD	SEM	Media	SD	SEM	
HIF1A	100	41,91	8,93	99,15	36,60	8,39	n.s.
ENG	100	42,95	9,15	115,1	46,52	10,67	n.s.
VEGF-A	100	48,68	10,15	133,0	63,89	15,06	n.s.
VEGFR1	100	46,88	9,77	255,8	190,7	43,74	***
VEGFR-2	100	55,71	11,88	196,4	125,3	30,39	**

### 4.1.3 COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE BIOMARCADORES A NIVEL PROXIMAL Y DISTAL.

Finalmente, realizamos una comparación entre los niveles relativos de cada marcador en la región de la unión safenofemoral (proximal) y en la región distal .



**Figura 53.** Expresión proximal y distal del factor inducible por hipoxia (HIF-1α).



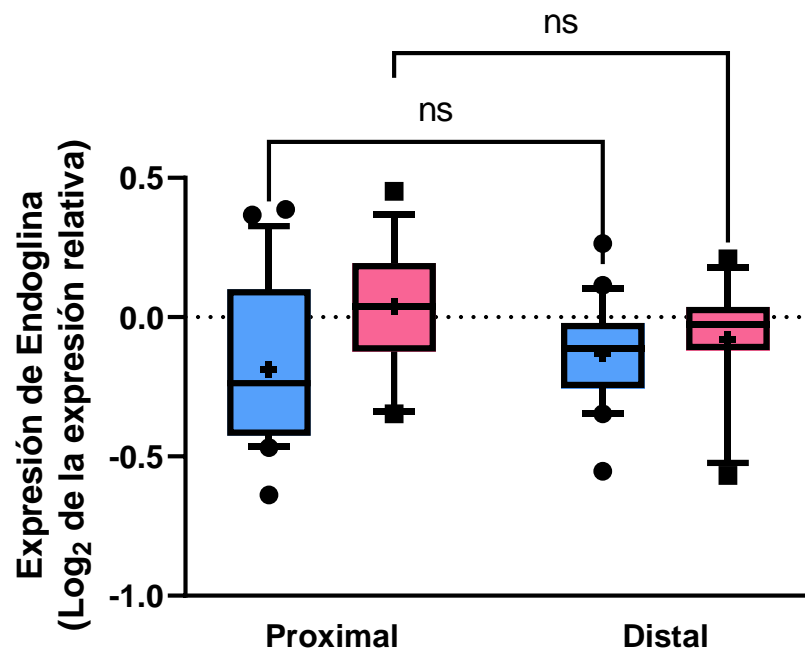


Figura 54. Expresión proximal y distal de Endoglin tisular.

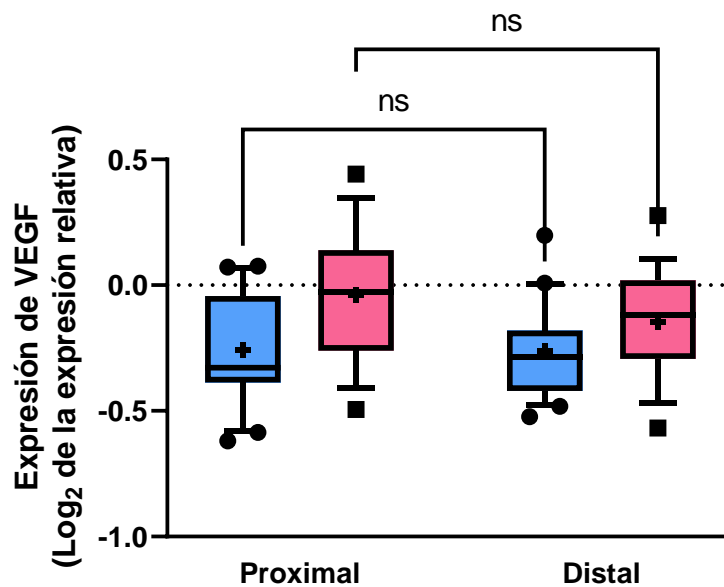
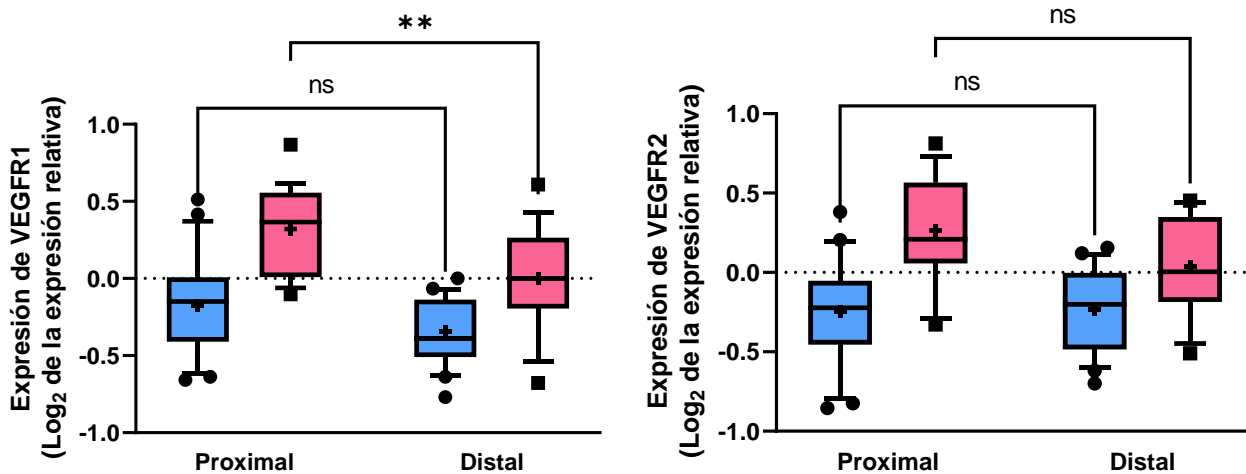


Figura 55. Expresión proximal y distal de VEGF-A.

Cuando realizamos una comparación de las muestras proximales y distales para HIF-1 $\alpha$ , Endoglin y VEGF-A como se muestran en las figuras 53,54 y 55, no se encuentran diferencias significativas en la expresión de cada biomarcador en las biopsias de tejido obtenidos a nivel proximal y distal.



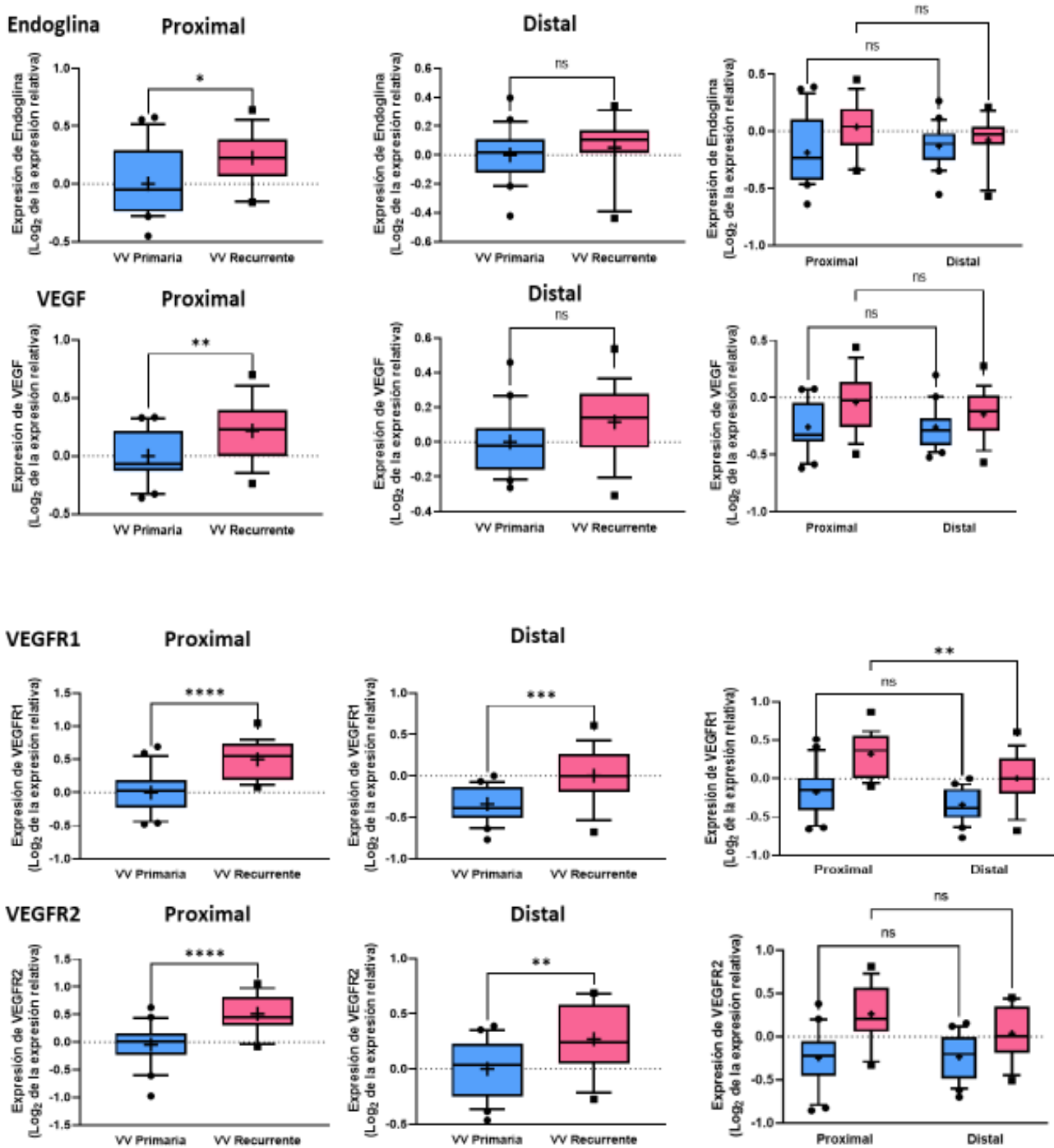
**Figura 56.** Expresión proximal y distal de los receptores VEGFR-1 Y VEGFR-2.

Finalmente se ha comparado la expresión de los dos receptores de VEGF entre las muestras proximales y distales. Para VEGFR-1 la expresión ha sido mayor en la zona proximal que en la distal y siempre mayor que en las muestras procedentes de pacientes con varices primarias. Por el contrario en el análisis de las diferencias en la expresión de VEGFR-2 en cada grupo en ambas localizaciones no se hallaron diferencias estadísticamente significativas siendo la expresión superior en el grupo 3 (RVV).

En resumen, nuestros resultados demuestran que la expresión de VEGFR1 es mayor en la zona proximal que en la distal y siempre mayor en las muestras procedentes de pacientes con varices recurrentes que en las muestras procedentes de los pacientes con varices primarias.

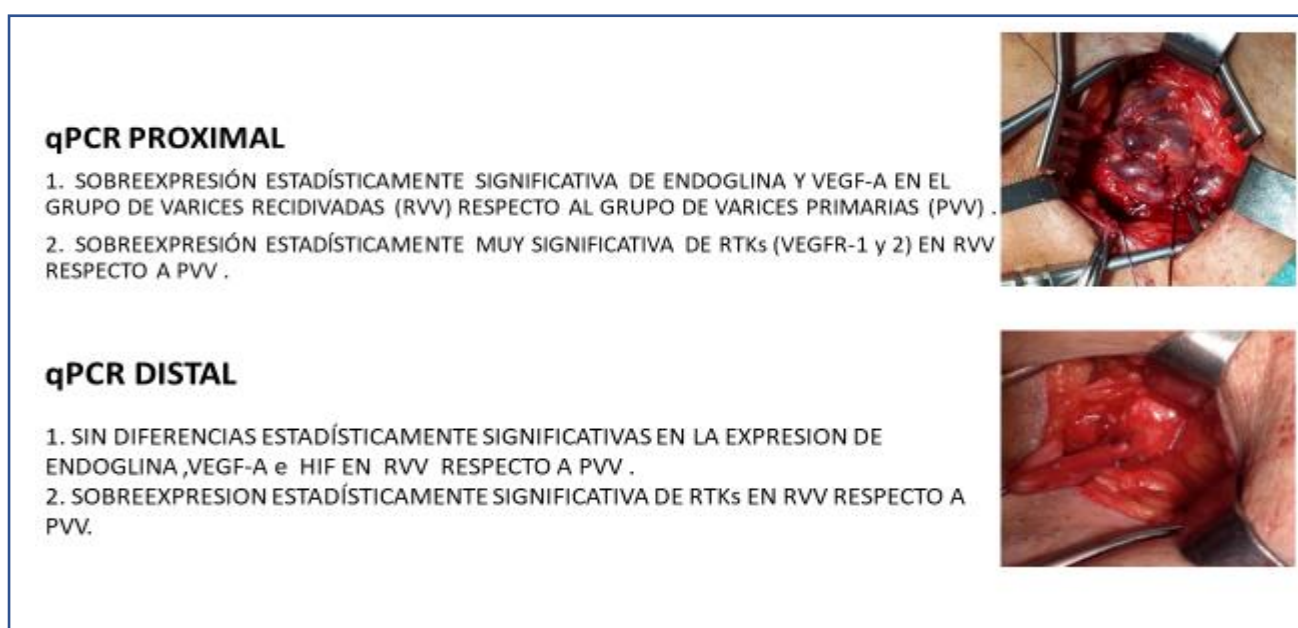
Con fines aclaratorios incorporo un cuadro resumen de los gráficos correspondientes a los resultados obtenidos en las determinaciones para biomarcadores de muestras tisulares mediante qPCR en la figura 57.

**Análisis tisulares por qPCR**



**Figura 57.** Resumen de determinaciones de qPCR seriadas de Endoglina, VEGF, VEGFR-1 y VEGFR-2

Igualmente, se presentan a modo de resumen algunos de los resultados de las determinaciones tisulares tanto a nivel proximal como distal en la figura 58.

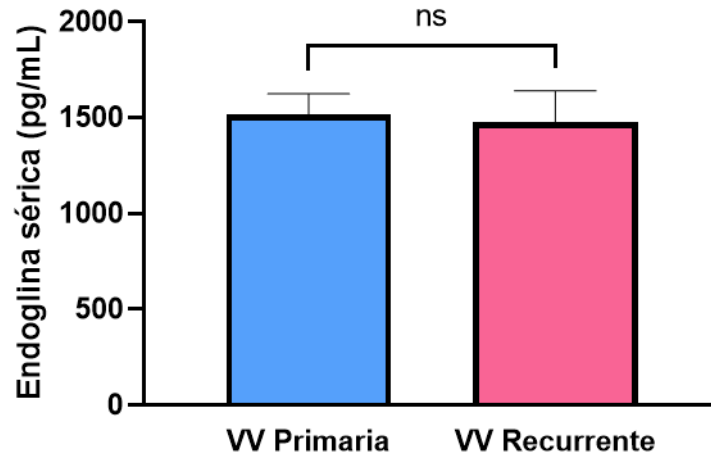


**Figura 58** Resumen resultados q PCR.

## 4.2 ANÁLISIS MULTIPLEXADO. EXPRESIÓN DE BIOMARCADORES EN SUERO POR GRUPOS

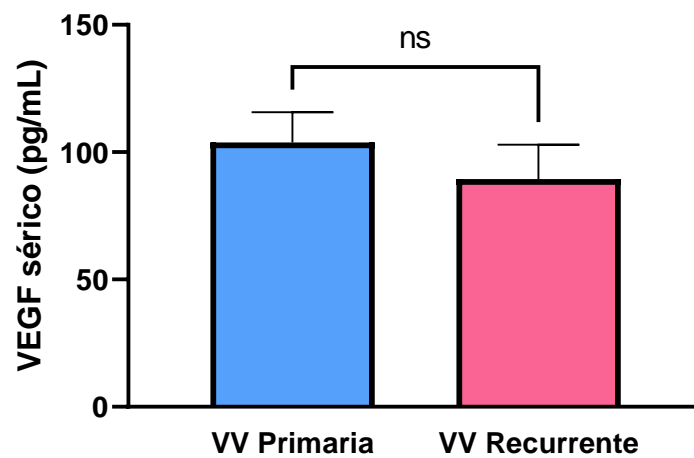
### 4.2.1 DETERMINACIONES PREOPERATORIAS DE BIOMARCADORES EN SUERO DÍA 0

Algunos de los marcadores utilizados en el estudio tienen una forma soluble que puede tener también propiedades pro- o anti-angiogénicas. Por ello se hicieron determinaciones de dichos factores para analizar sus niveles séricos y su posible efecto sobre el paciente. La primera determinación se realizó preoperatoriamente (día 0), y posteriormente, se tomó una segunda muestra postoperatoria en una revisión de seguimiento a los 3 meses.



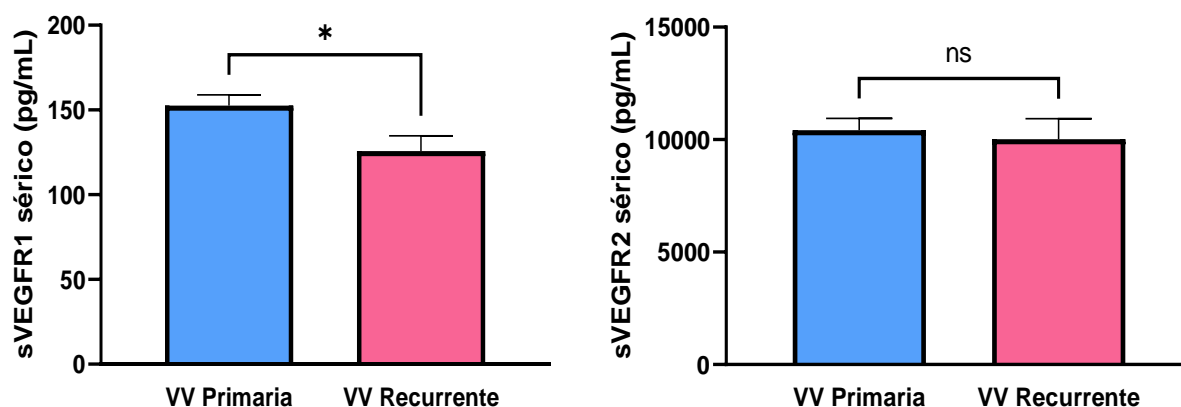
**Figura 59** Expresión sEng en suero día 0.

El análisis multiplexado de los niveles de Endoglina soluble presente en las muestras de suero obtenidas en el ingreso inmediatamente antes de realizarse la intervención quirúrgica, no mostraron diferencias significativas entre los pacientes con varices primarias respecto al grupo de pacientes con recidiva desde la unión safenofemoral.



**Figura 60.** Expresión de VEGF en suero día 0.

De igual manera que en el análisis anterior, cuando se cuantificó VEGF-A los datos tampoco revelaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (PVV y RVV).



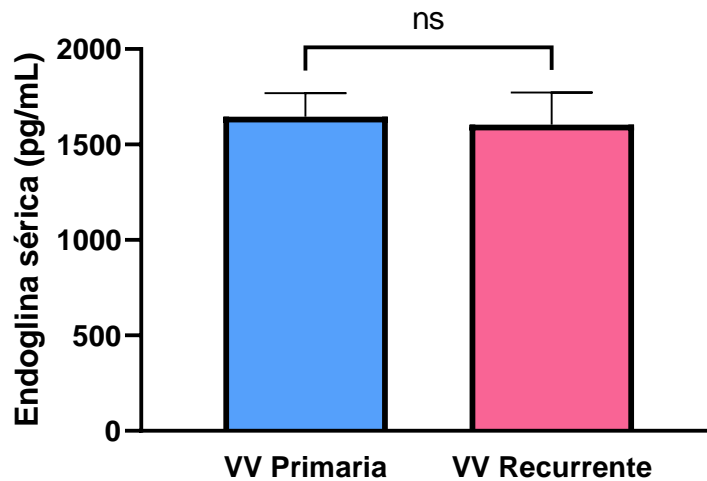
**Figura 61.** Expresión de VEGFR-1 Y VEGFR-2 en suero día 0

En el estudio de la expresión correspondiente a los receptores VEGFR-1 presentó diferencias estadísticamente significativas con una menor expresión de VEGFR-1 para el grupo de pacientes con diagnóstico de varices recidivadas en comparación con el grupo de pacientes con varices primarias. Cuando el análisis se realizó sobre el receptor VEGFR-2 por el contrario la expresión de VEGFR-2 en las muestras de suero no revelaron diferencias significativas entre ambos grupos.

En la tabla 11 se detallan los datos de media, desviación standard (SD) y error de standard de la media (SEM) en cada uno de los genes analizados en suero en el día 0 para ambos grupos, y el nivel de significación para cada comparación

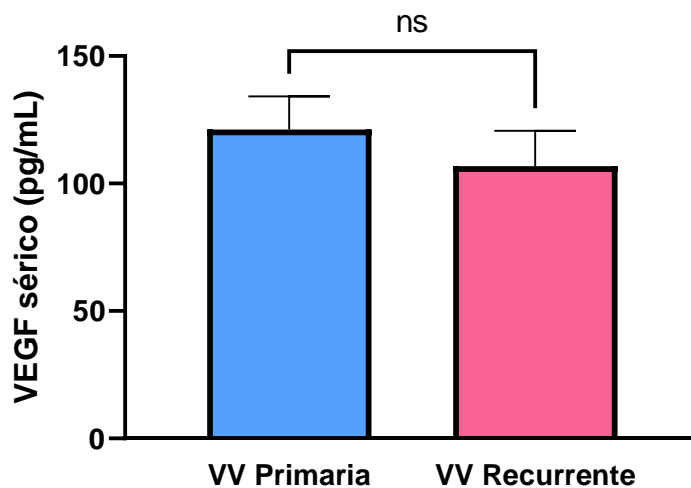
**Tabla 11.** Biomarcadores y resultados estadísticos de las determinaciones de suero día 0.

Factores analizados	Vena Varicosa Primaria			Vena Varicosa Recurrente			p-valor
	Media	SD	SEM	Media	SD	SEM	
sEng	1516	780,1	108,2	1476	629,7	162,6	n.s.
VEGF	103,8	85,59	11,87	89,41	52,57	13,57	n.s.
sVEGFR1	152,6	45,53	6,314	125,8	34,75	8,973	*
sVEGFR-2	10419	3806	527,7	10018	3544	915	n.s.

**4.2.2 DETERMINACIONES POSTOPERATORIA DE BIOMARCADORES EN SUERO. CONTROL (3 MESES).**

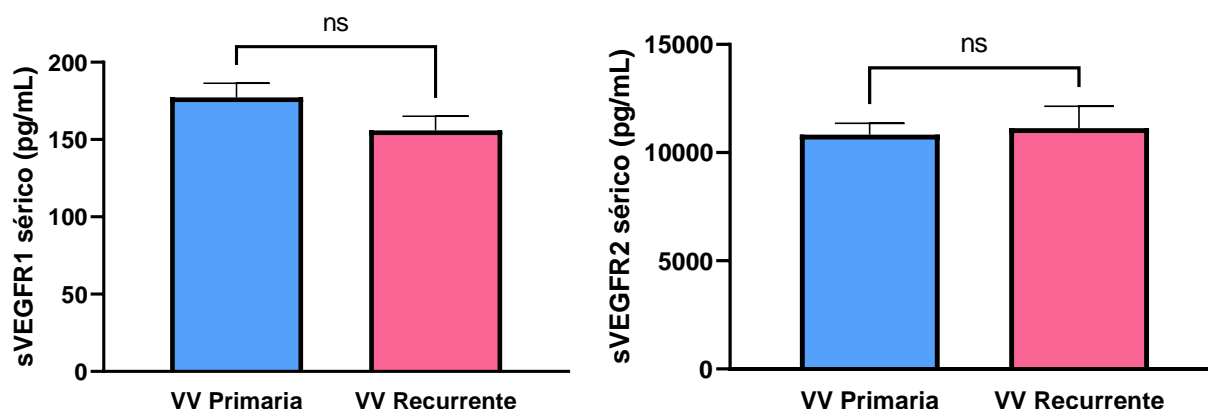
**Figura 62.** Expresión de Endoglina soluble en suero. Control a los 3 meses.

El análisis mediante multiplex de las determinaciones para endoglina soluble en el control postoperatorio en el tercer mes no demostró diferencias entre los dos grupos.



**Figura 63.** Expresión de VEGF en suero. Control a los 3 meses.

Igualmente, cuando se hicieron las determinaciones para VEGF, al igual que para sEng, tampoco se encontraron significativas entre ambos grupos



**Figura 64.** Expresión de VEGFR-1 y VEGFR-2 en suero. Control a los 3 meses.

Por último, los resultados para el estudio de la expresión correspondiente a los receptores de VEGF-A, en este caso no mostraron diferencias tanto para VEGFR-1, como para VEGFR-2 entre ambos grupos.

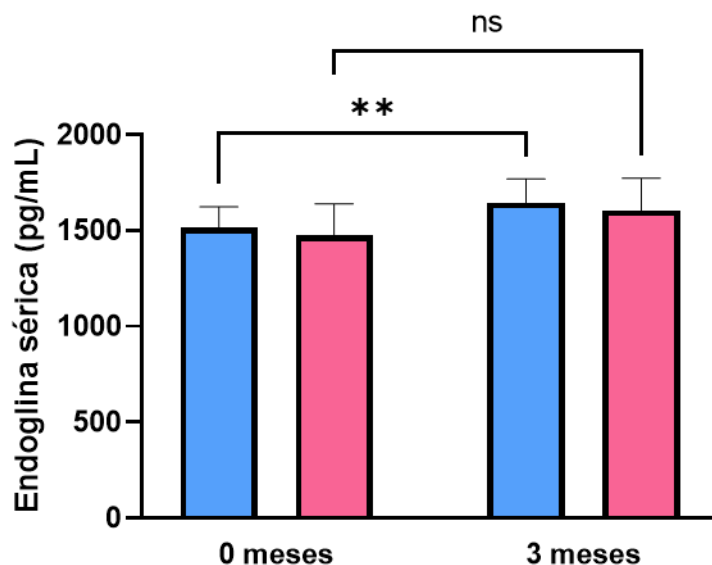
En la tabla 12 se describen los resultados de media, desviación standard (SD) y error de standard de la media (SEM) para ambos grupos en cada uno de los genes analizados en suero a los tres meses y el nivel de significación de cada comparación.

**Tabla 12.** Biomarcadores y resultados estadísticos de las determinaciones de suero a 3 m

Factores analizados	Vena Varicosa Primaria			Vena Varicosa Recurrente			p-valor
	Media	SD	SEM	Media	SD	SEM	
sEng	1645	893,1	123,8	1604	653,7	168,8	n.s.
VEGF	121,2	93,17	12,92	106,8	53,75	13,88	n.s.
sVEGFR1	177,3	66,02	9,156	156	35,04	9,046	n.s.
sVEGFR-2	10834	3747	519,7	11136	3882	1002	n.s.

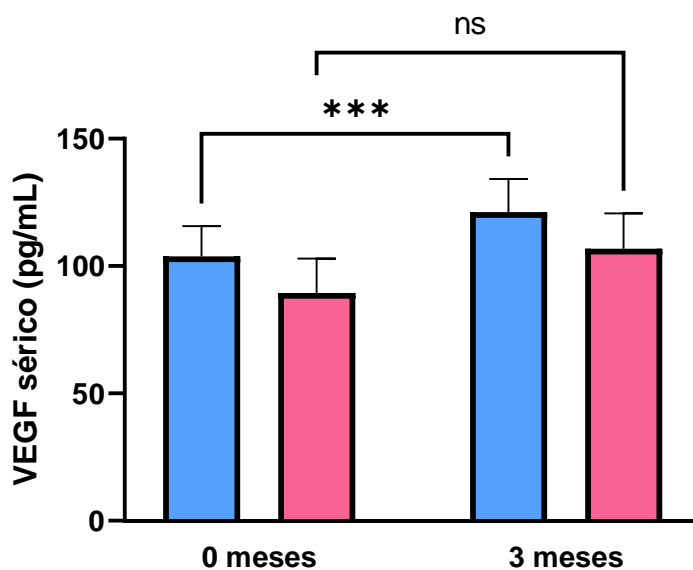


**4.2.3 DETERMINACIONES COMPARADAS DE BIOMARCADORES. DÍA 0 /CONTROL 3 MESES**



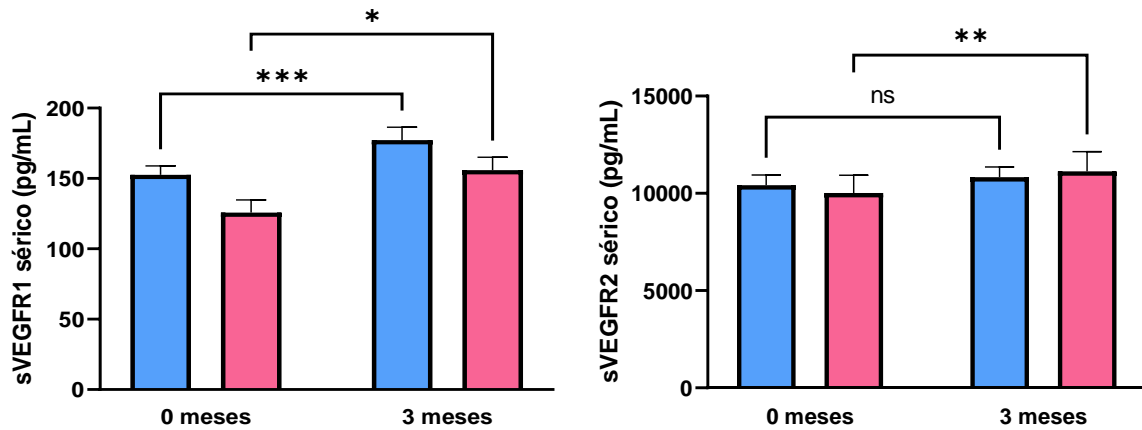
**Figura 65.** Expresión de Endoglina soluble en suero. Día 0 y control 3 meses.

Cuando se compararon los niveles de sEng preoperatoria y postoperatoria entre ambos grupos se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el grupo de las varices primarias, pero no se encontró significación en el grupo de las varices recidivadas. En ambos grupos se evidenció una tendencia creciente en las determinaciones postoperatorias.



**Figura 66.** Expresión de VEGF en suero. Día 0 y control 3 meses.

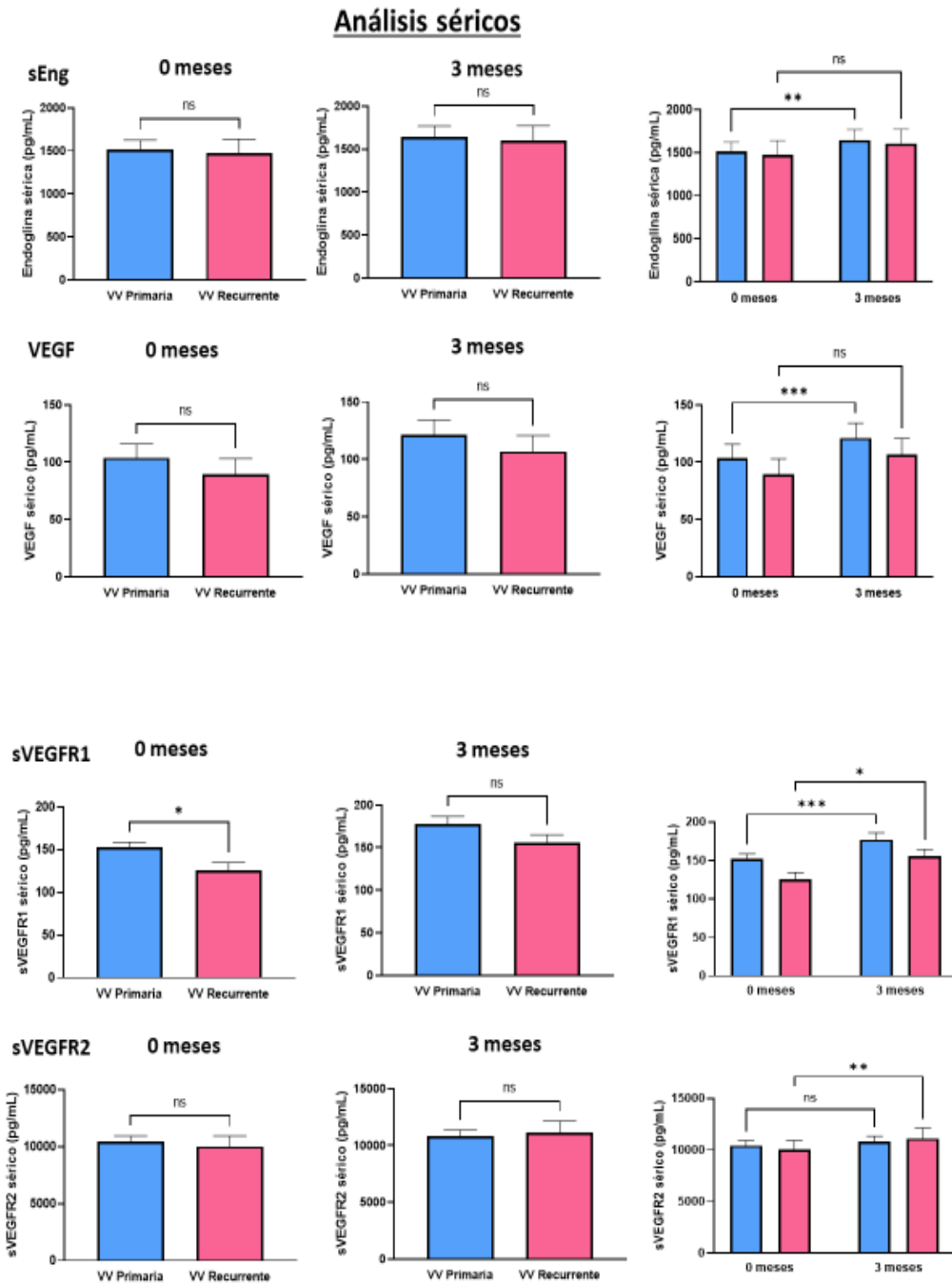
Análogamente, cuando las determinaciones corresponden a VEGF-A la significación estadística se encuentra en el grupo de varices esenciales, pero no se confirma en el grupo de varices recidivadas (RVV).



**Figura 67.** Expresión de VEGFR-1 y VEGFR-2 en suero. Día 0 y control 3 meses.

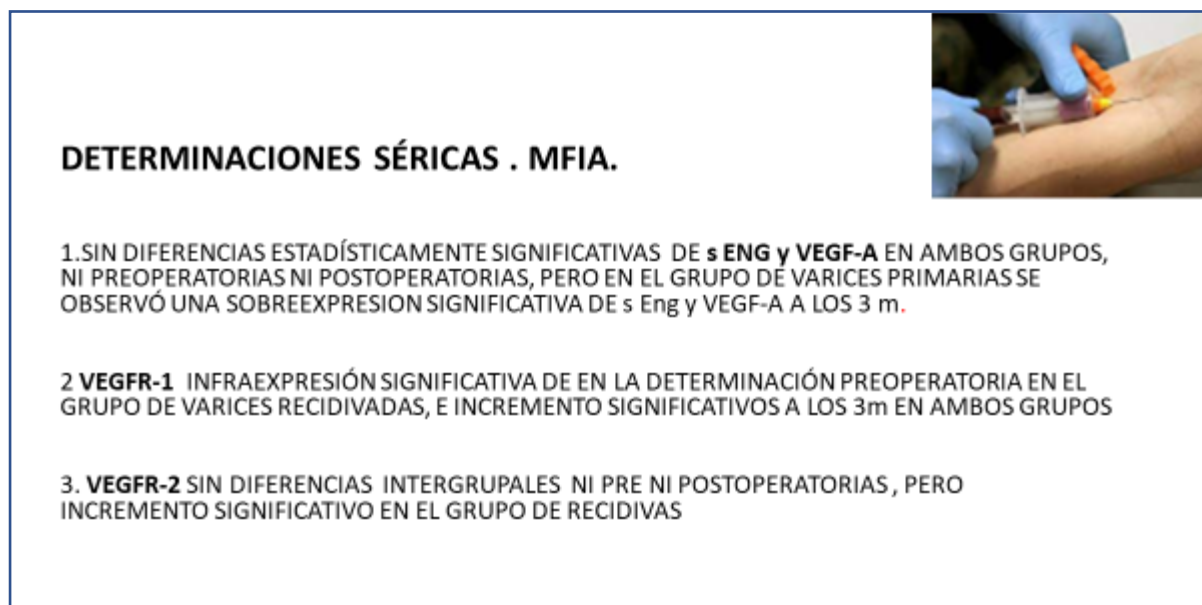
Por último, cuando se compararon las determinaciones correspondientes a ambos receptores, para VEGFR-1 se evidenciaron diferencias significativas entre las determinaciones pre y postoperatorias de ambos grupos y como en los datos correspondientes a los marcadores previos, con mayor significación en el grupo correspondiente a las varices esenciales frente a las recidivadas. Sin embargo, en el análisis de VEGFR-2 no se evidenciaron diferencias en el grupo de varices primarias y si las hubo en el grupo de varices recidivadas con sobreexpresión para ambos receptores.

Con finalidad aclaratoria se incorpora nuevamente un cuadro resumen de todos los resultados de las determinaciones séricas pre y postoperatorias en la figura 68.



**Figura 68.** Determinaciones séricas seriadas de Endoglina, VEGF, VEGFR-1 y VEGFR-2.

Igualmente, se presentan a modo de resumen algunos de los resultados de las determinaciones séricas de los biomarcadores en la figura 69



**Figura 69.** Resumen resultados de determinaciones séricas. MFIA

#### 4.3 EXPRESIÓN DE BIOMARCADORES SEGÚN GRADO C DE CEAP

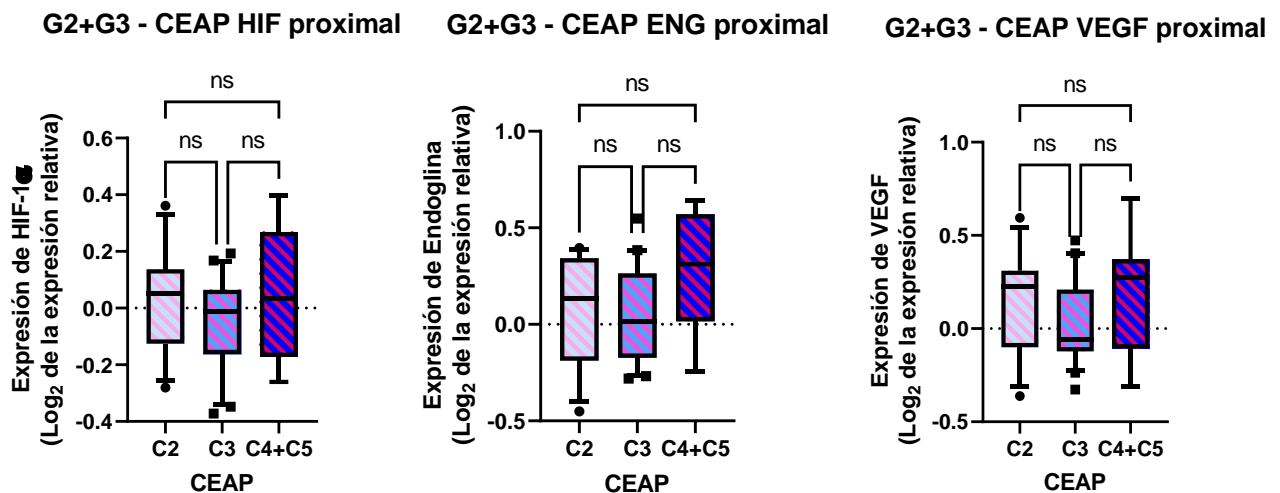
Nos hemos preguntado si el grado evolutivo de la enfermedad varicosa, definido en el epígrafe C de la clasificación CEAP, puede afectar a la expresión génica de los marcadores de angiogénesis. Para ello hemos analizado la correlación entre la expresión tisular en las muestras biópsicas y sérica de los biomarcadores en relación con la presentación clínica en ambos grupos en el momento de la intervención quirúrgica. La clasificación CEAP C para el total de pacientes se distribuiría según la tabla. Para todos ellos, el resto de variables CEAP se completaría como de etiología primaria, con afectación anatómica del sistema venoso superficial y por reflujo (CEAP C<sub>2/3/4/5</sub>, E<sub>p</sub>, A<sub>s</sub>, Pr).

**Tabla 13.** CEAP Grupo 2 (VV) y Grupo 3 (RVV)

CEAP C	CEAPC2	CEAPC3	CEAP C4/5
Grupo 2 Varices primarias VV	6	12	6
Grupo 3 Varices recurrentes RVV	6	12	3

### 4.3.1 EXPRESIÓN TISULAR PROXIMAL DE BIOMARCADORES SEGÚN GRADO CEAP

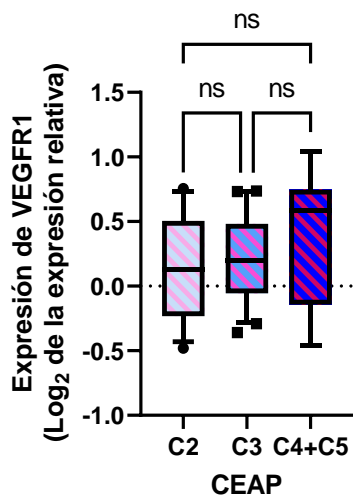
En primer lugar analizamos la expresión génica de los distintos marcadores en las biopsias de la unión safenofemoral. Los resultados en el análisis qPCR no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de HIF, Endogлина y VEGF-A en las muestras biópsicas inguinales en relación con el grado clínico evolutivo (CEAPC2,3,4/5) en el total de pacientes de ambos grupos (n =45).



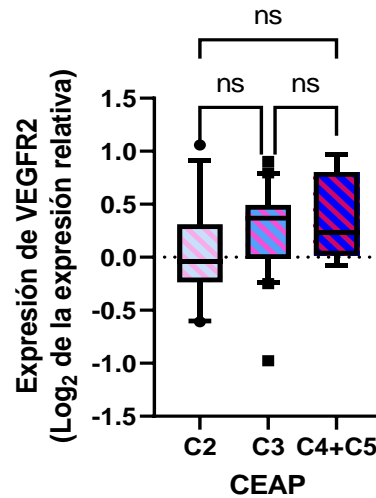
**Figura 70.** CEAP y expresión tisular proximal de HIF, Endogлина y VEGF-A.

Igualmente, la expresión de los receptores de VEGFR-1 y VEGFR-2 en las biopsias inguinales de ambos grupos tampoco presentaron correlación con la expresión clínica evolutiva de la enfermedad varicosa.

**G2+G3 - CEAP VEGFR1 proximal**



**G2+G3 - CEAP VEGFR2 proximal**

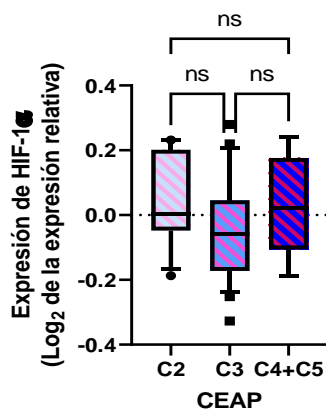


**Figura 71.** CEAP y expresión tisular proximal de VEGFR-1 Y VEGFR-2.

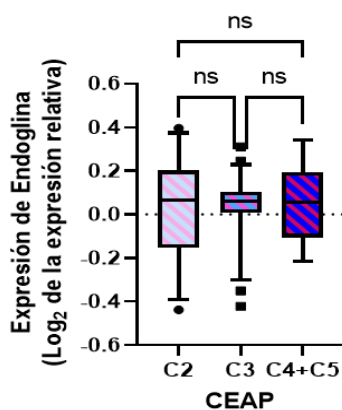
**4.3.2 EXPRESIÓN TISULAR DISTAL DE BIOMARCADORES SEGÚN GRADO CEAP**

Cuando el análisis se particularizó en el estudio de las biopsias distales de ambos grupos, de nuevo los resultados para HIF, Endoglina y VEGFA fueron correlativos con los encontrados para las muestras proximales sin indentificar diferencias según el grado C del CEAP.

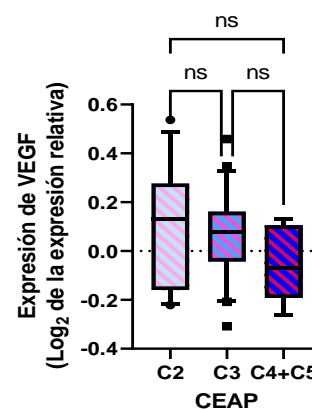
**G2+G3 - CEAP HIF distal**



**G2+G3 - CEAP ENG distal**



**G2+G3 - CEAP VEGF distal**



**Figura 72.** CEAP y expresión tisular distal de HIF, Endoglina y VEGF-A.

De manera correlativa a las muestras proximales, la expresión distal tampoco evidenció significación en la expresión de los dos receptores de VEGF.

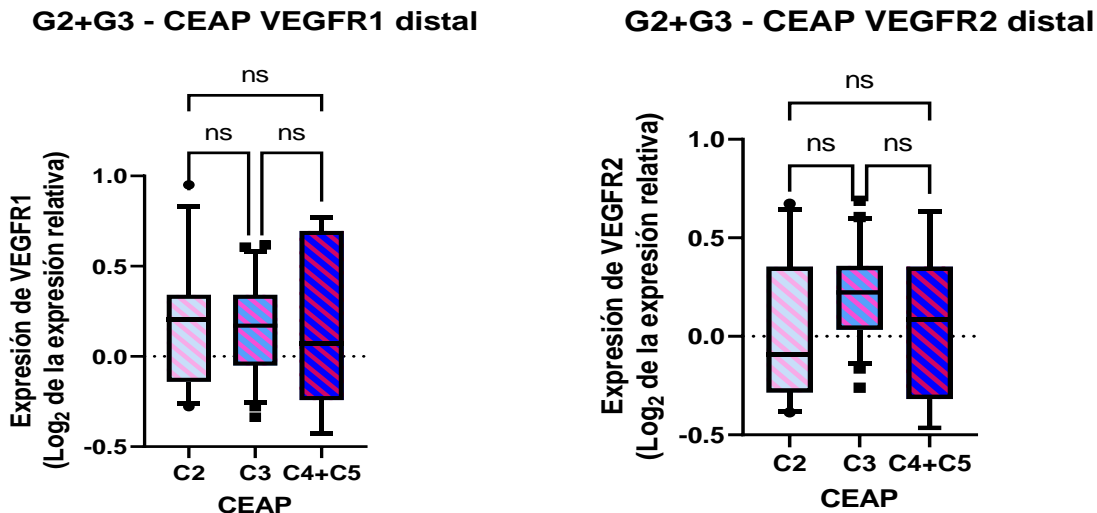


Figura 73. CEAP y expresión tisular proximal de VEGFR-1 Y VEGFR-2.

**4.3.3 EXPRESIÓN TISULAR DE BIOMARCADORES SEGÚN GRADO CEAP Y GRUPO DE VARICES PRIMARIAS O RECIDIVADAS.**

Se realizó el mismo análisis segmentando el grado de CEAP por cada grupo, según fueran pacientes con varices primarias o recidivadas. Se repitieron los resultados y el grupo 2 (VV) de varices primarias no demostró diferencias para HIF, Endoglina y VEGF-A según el grado CEAP para las muestras proximales.

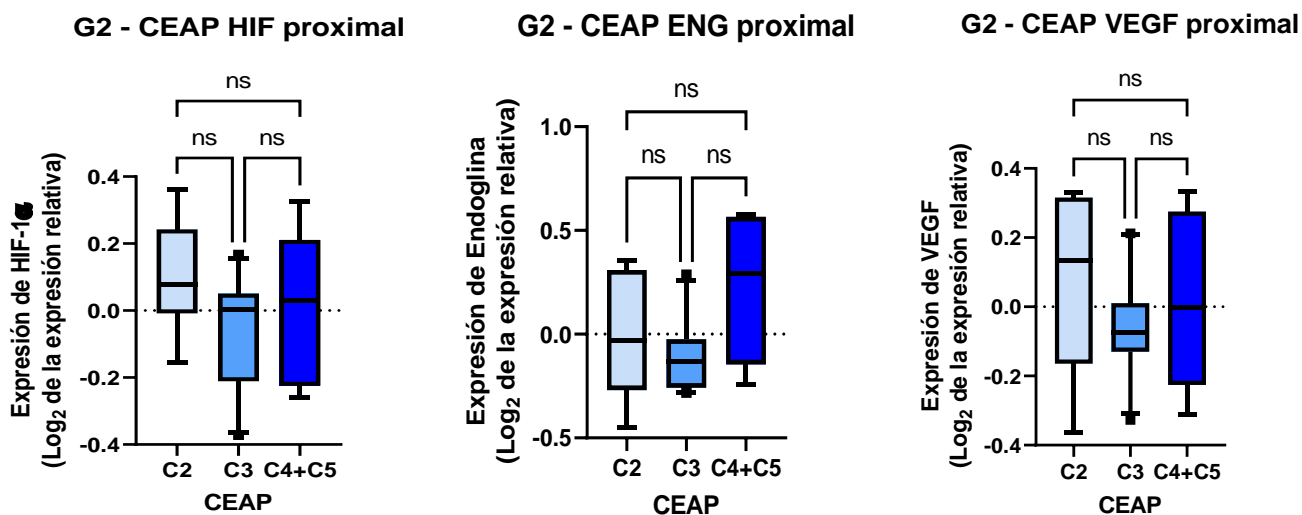
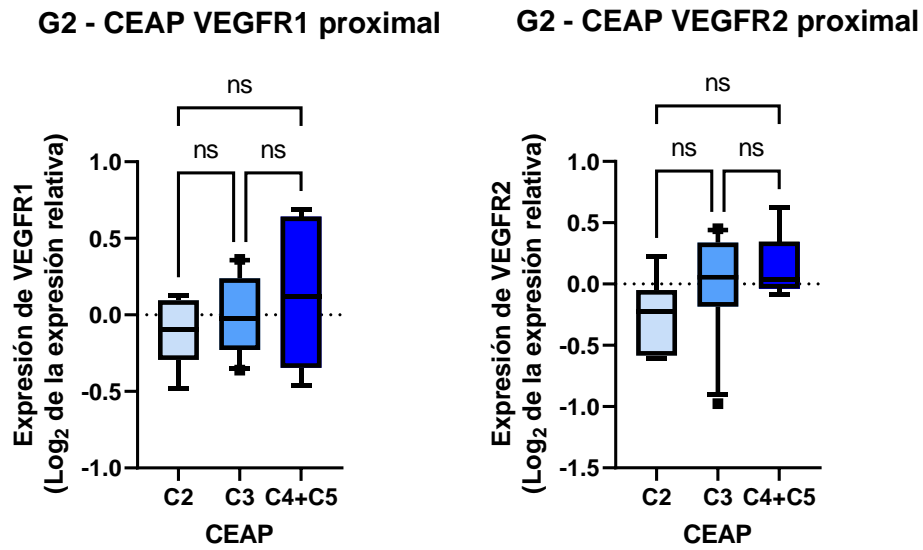


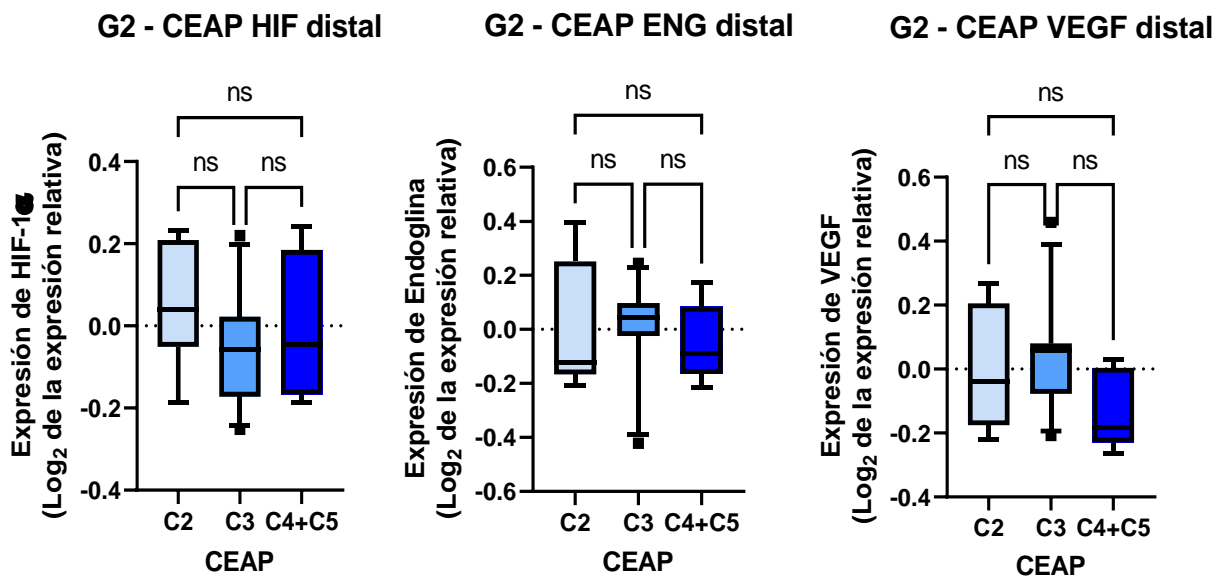
Figura 74. CEAP y expresión tisular proximal de HIF, Endoglina y VEGF-A en varices primarias.

Análogamente la expresión de los receptores de VEGF tampoco presentó resultados significativos en el análisis CEAP.



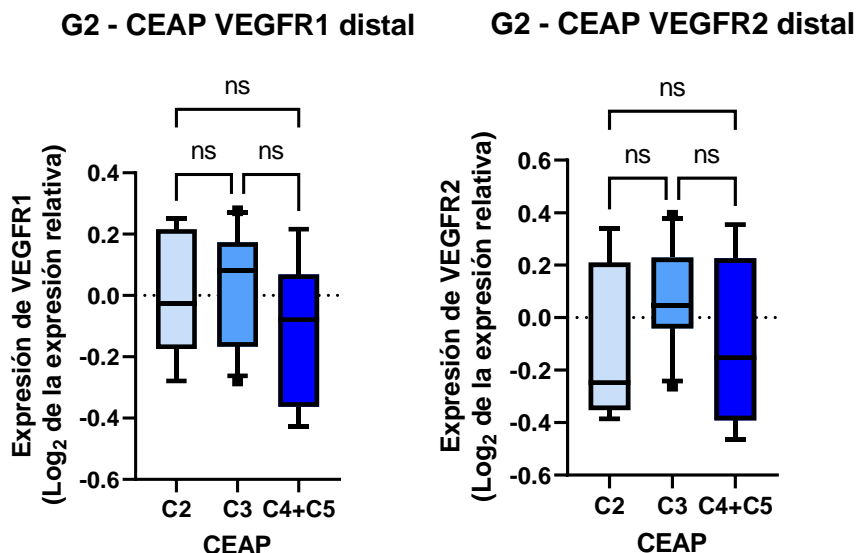
**Figura 75.** CEAP y expresión tisular proximal de VEGFR-1 y VEGFR-2 en varices primarias.

Los resultados se volvieron a repetir, sin encontrar diferencias según CEAP, tanto para HIF , Endoglina y VEGF , como para sus receptores cuando el análisis estadístico se realizó en el sugrupo de muestras distales en el grupo de varices primarias (VV) .



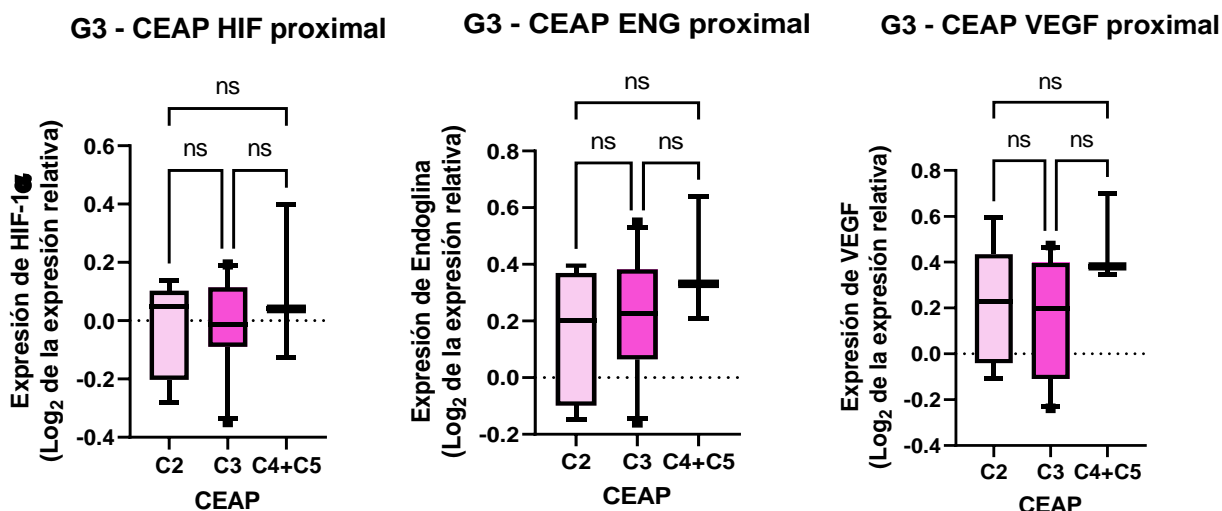
**Figura 76.** CEAP y expresión tisular distal de HIF, Endoglina y VEGF-A en varices primarias.



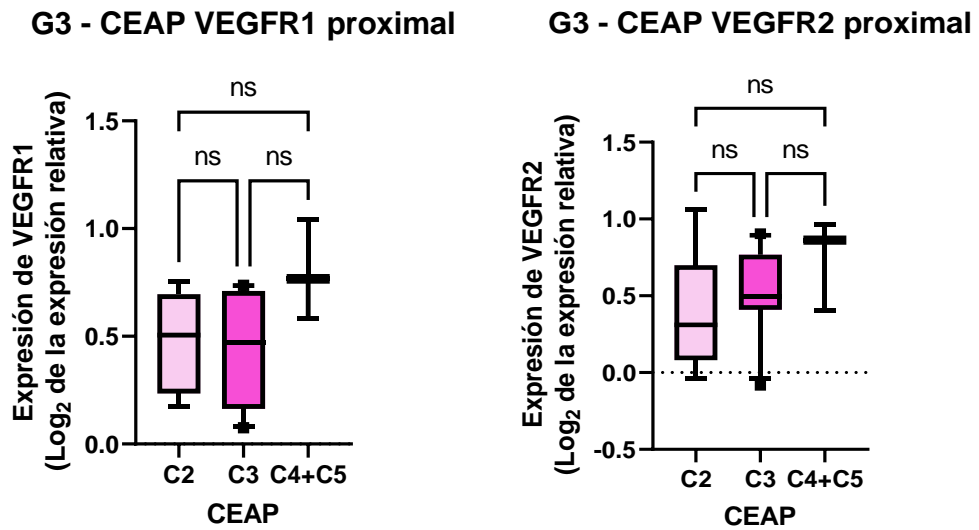


**Figura 77.** CEAP y expresión tisular distal de VEGFR-1 y VEGFR-2 en varices primarias.

En el análisis CEAP del subgrupo de pacientes con varices recidivadas (RVV) los datos relativos a las muestras proximales no mostraron diferencias según el grado clínico en la expresión de ninguno de los biomarcadores, ni de los receptores de VEGFR-1 y VEGFR-2.

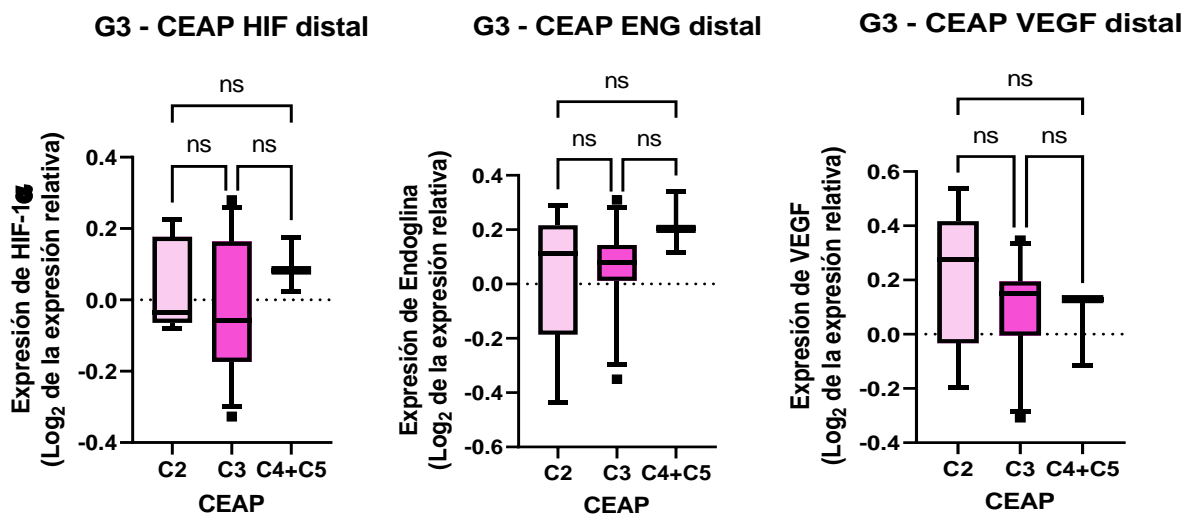


**Figura 78.** CEAP y expresión tisular distal de HIF, Endoglina y VEGF-A en varices recidivadas.



**Figura 79.** CEAP y expresión tisular distal de VEGFR-1 y VEGFR-2 en varices recidivadas.

Cuando los análisis se segmentaron en las muestras distales resultados se repitieron sin hallar significación relativa al grado CEAP en ninguno de los marcadores de nuestro estudio.



**Figura 80.** CEAP y expresión tisular distal de HIF, Endoglin y VEGF-A en varices recidivadas.

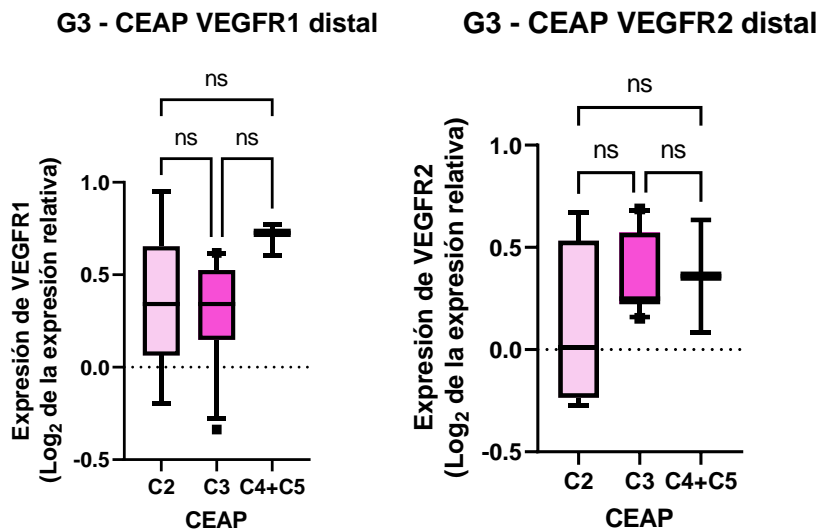


Figura 81. CEAP y expresión tisular distal de VEGFR-1 y VEGFR-2 en varices recidivadas.

#### 4.3.4 EXPRESIÓN SÉRICA DE BIOMARCADORES SEGÚN GRADO CEAP

La correlación CEAP de los resultados de las determinaciones séricas obtenidas en el momento de la intervención quirúrgica, y sometidas a multiplexado para el total de pacientes del grupo 2 y 3 no revelaron diferencias significativas ni para Endoglina soluble (sEng) ni para VEGF-A o sus dos receptores, en concordancia con lo visto en las correlaciones establecidas con anterioridad.

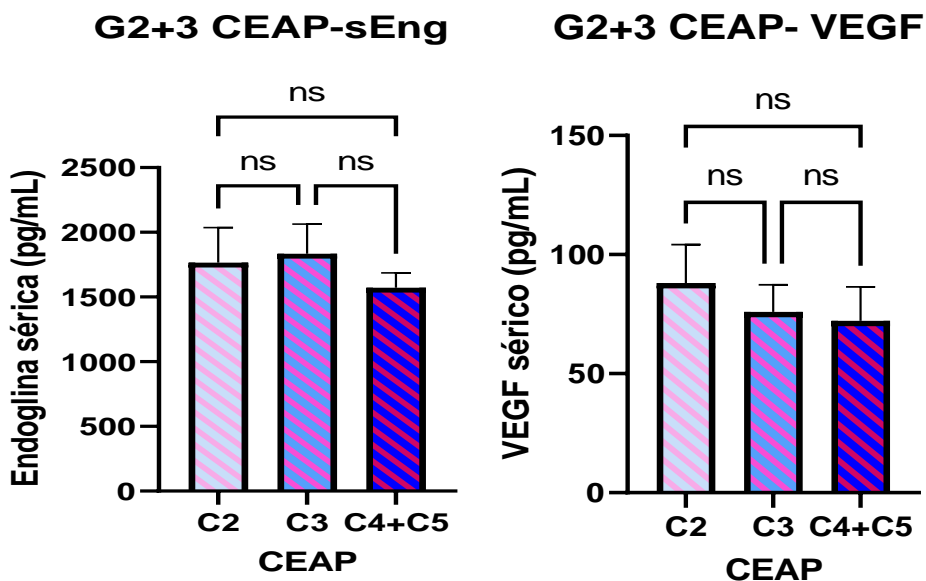
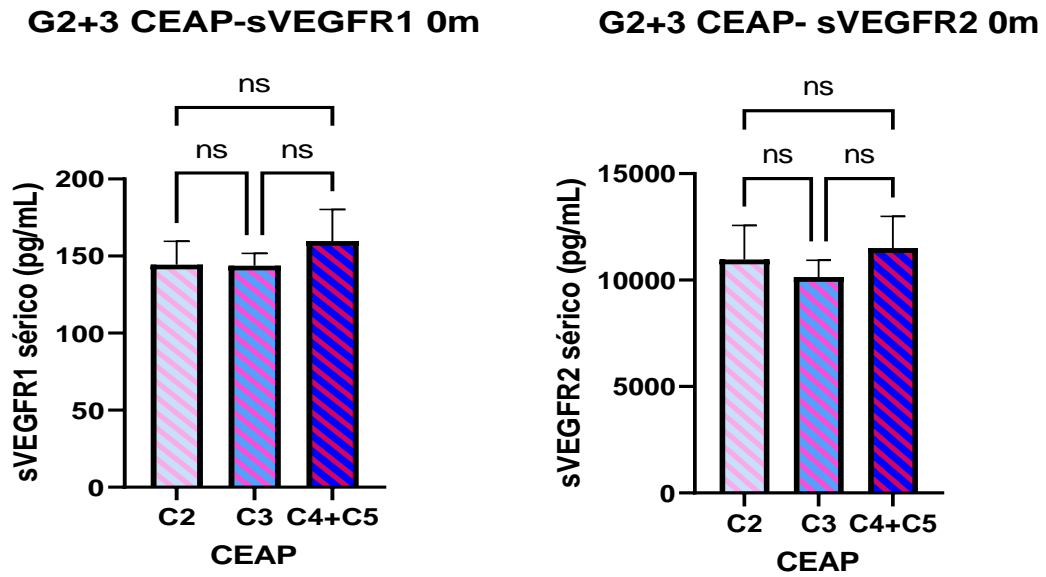


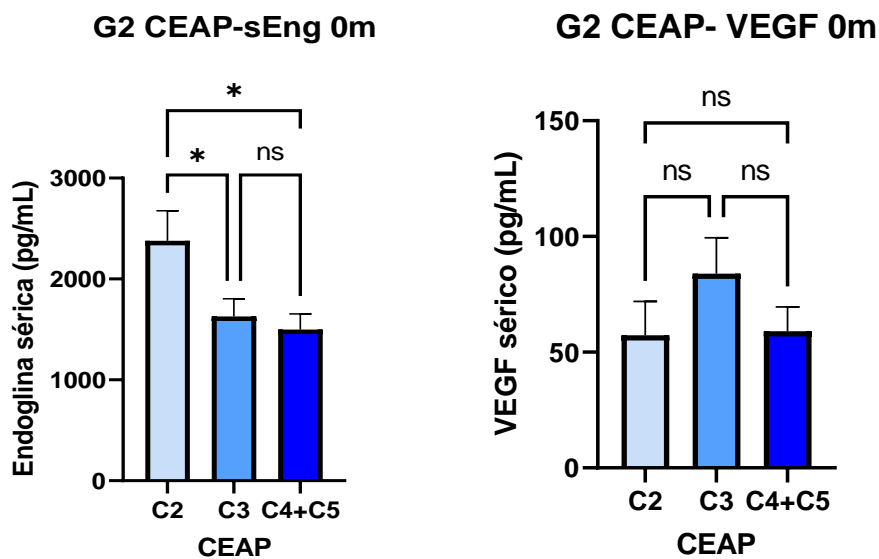
Figura 82. CEAP y expresión sérica de Endoglina y VEGF-A.



**Figura 83.** CEAP y expresión sérica de VEGFR-1 y VEGFR-2

**4.3.5 EXPRESIÓN SÉRICA DE BIOMARCADORES SEGÚN GRADO CEAP Y GRUPO DE VARICES PRIMARIAS O RECIDIVADAS.**

Cuando se analizó la expresión sérica según CEAP por grupos, para el grupo de varices primarias (VV), los resultados muestran una sobreexpresión significativa de endoglina soluble para los grados CEAPC2 respecto a los grados CEAPC3-4/5, diferencias que no se observaron ni para VEGF-A, ni para sus receptores.



**Figura 84.** CEAP y expresión sérica de Endoglina y VEGF-A en varices primarias.

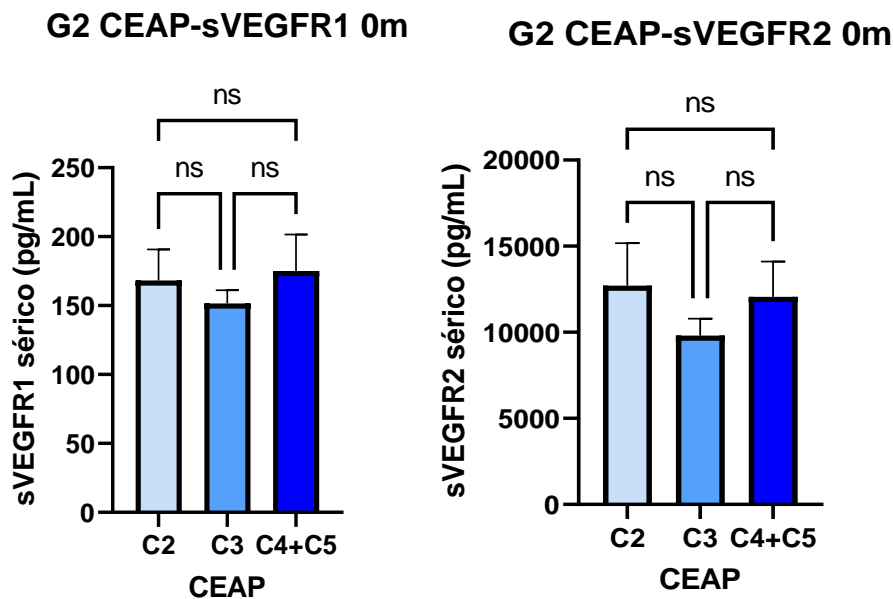


Figura 85. CEAP y expresión sérica de VEGFR-1 y VEGFR-2 en varices primarias.

El análisis CEAP concluyó analizando los datos séricos correspondientes al grupo 3 de varices recidivadas (RVV). De nuevo se repitió la tendencia observada durante el estudio de la correlación CEAP, y no se evidenciaron diferencias significativas ni para endoglina soluble ni para VEGF, ni sus receptores.

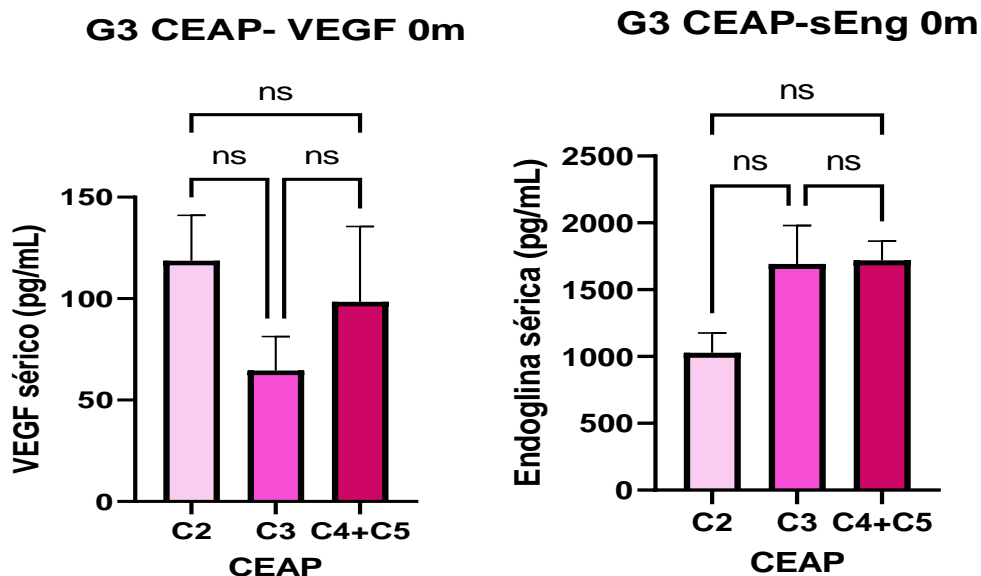


Figura 86. CEAP y expresión sérica de Endoglina y VEGF-A en varices recidivadas.

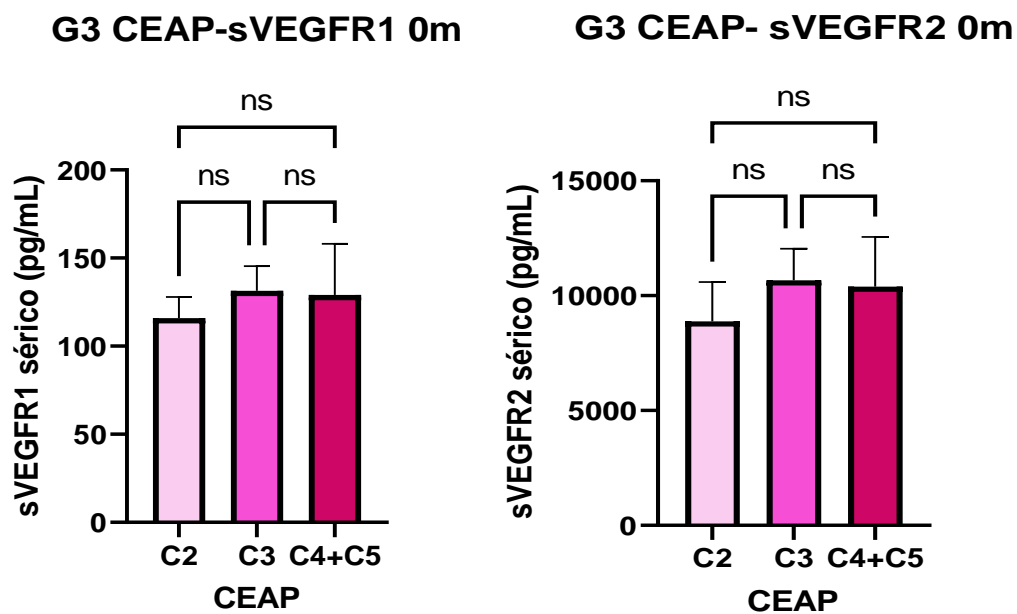


Figura 87. CEAP y expresión sérica de VEGFR-1 y VEGFR-2 en varices recidivadas.

**DISCUSIÓN**





## V. DISCUSIÓN.

Los últimos 25 años en la investigación básica de la enfermedad varicosa han incorporado importantes cambios con nuevos protagonistas como la genómica o la proteómica. En este reenfoque desde los conceptos hemodinámicos tradicionales de hipertensión venosa y stress endotelial, se asocian de manera interrelacional cambios biomoleculares complejos, sincrónicos, sinérgicos y dependientes, que definen la disfunción endotelial. En ese microambiente participan un universo de células inflamatorias reclutadas y activadas, y sus arsenales moleculares de citokinas, chemokines, proteinasas, con mención especial a los mediadores moleculares del stress oxidativo y a las cascadas de señalización. Por ello como en la búsqueda del grail, en este camino con frecuencia se plantean más preguntas que respuestas y los interrogantes de la enfermedad varicosa persisten.

Desde que Babcock propusiese la ligadura alta de la vena safena interna para el tratamiento de las varices este procedimiento ha sido el standard terapéutico durante el último siglo. Persigue un doble objetivo, la interrupción del reflujo desde el sistema venoso profundo hasta el superficial, y la eliminación de las ramas venosas varicosas. Pese a su dilatadísimo recorrido y pese a los avances, determinados aspectos de la recidiva postoperatoria neoangiogénica persisten como una poderosa incógnita.

La presencia de nuevas venas tortuosas entre la vena femoral común y varices tronculares recidivadas fue confirmada flebográficamente por Glass en 1987, denominándolo "neovascularización" e informó que es causa principal de recurrencia. Se planteó posteriormente que era una respuesta biológica local al bloqueo completo de la circulación por la ligadura de la unión safenofemoral (Jones *et al.* 1996). Contrariamente, otros autores cuestionaron esta idea por no poder confirmar el estudio histológico e inmunológico evidencias de neovascularización en las venas varicosas recurrentes inguinales y plantearon que las venas recurrentes pueden ser ramas remanentes desarrolladas por adaptación a una hemodinámica localmente alterada (El Wajeh *et al.*, 2004). Su incidencia real también era otro motivo de controversia, comunicándose que representaba solo el 8,2% de las recurrencias y que la ligadura realizada de manera técnicamente incompleta era la causa más común de recurrencia (Egan *et al.*, 2006).

También su diagnóstico presenta dificultades. Por un lado, siendo el eco-doppler confiable, su validez en la clasificación de los diferentes tipos de vasos inguinales recurrentes se ha calificado como limitada con una sensibilidad del 62% (Geier *et al.*, 2009). Por otro, la validez en la identificación macroscópica de la neovascularización también ha comunicado una baja sensibilidad del 42,1% (aunque inversamente sí puede reconocerse intraoperatoriamente la falta de neovascularización con precisión) y

por ello se ha planteado que el diagnóstico de recurrencia inguinal no debe basarse únicamente en los hallazgos macroscópicos (origen anómalo del vaso de la vena femoral, presencia de tejido cicatricial, torsión vascular, ramificación anómala, pared vascular más delgada) precisándose criterios histológicos (estructura de pared incompleta, deficiencia de válvulas y de fibras nerviosas intramurales, morfología inusual del espacio intravascular y presencia de tejido cicatricial) para confirmarla (Geier et al.2005).

Otros autores han puesto el acento en la dificultad de la diferenciación entre muñón largo y neocayado pudiendo en la práctica ambas situaciones coexistir y han evidenciado una mayor expresión de la decorina del tejido conectivo en los cayados angiogénicos frente a una baja expresión en muñones redundantes tras una ligadura baja del cayado safeno-femoral (Reich-Schupke *et al.*, 2011).

Todo esto pudo contribuir a haberse observado grandes diferencias en su incidencia en la recurrencia varicosa con un amplísimo rango de entre el 25% y el 94% de RVV (Kostas et al., 2004, van Rij et al., 2004). En un intento de superar tales limitaciones se han publicado recientemente estudios de cuantificación utilizando imágenes de reconstrucción tridimensional (White et al., 2021) y estudios de análisis histopatológico de las muestras quirúrgicas (Ehrler et al., 2021).

Por ello, la confianza en la efectividad del tratamiento standard para prevenir la recurrencia varicosa se ha visto reducida y su efectividad en comparación con otras técnicas diferentes ha sido motivo de discusión. El estudio RELACS atribuye iguales tasas de recurrencias comparando láser (EVLA) con la ligadura safeno-femoral y *stripping* (Rass *et al.*, 2015). Un estudio posterior tampoco encontró diferencias en términos de recurrencias entre la cirugía convencional y endovenosa, aunque las recurrencias son diferentes, siendo la neovascularización más frecuente tras la primera y la recanalización más frecuente tras las técnicas de ablación endovenosa (O'Donnell et al 2016). Finalmente, una revisión sistemática reciente, respaldada por tres sociedades vasculares, confirma que la ligadura y el *stripping* safeno altas tienen resultados a largo plazo similares a las de las técnicas quirúrgicas más modernas (Farah *et al.*, 2021).

Desde el punto de vista intraoperatorio se contemplan aspectos relativos a la técnica quirúrgica como el traumatismo ocasionado y el esparcimiento de células endoteliales, el riesgo de hematoma inguinal postoperatorio o los diferentes materiales empleados tanto para la hemostasia como para las suturas (empleo de materiales absorbibles como los derivados del ácido poliglicocólico e irreabsorbibles como la seda o el polipropileno). Para reducir el estímulo de la angiogénesis postquirúrgica, se han ideado técnicas profilácticas de barrera como el cierre de la fascia cribiforme (De Maeseneer *et al.*, 2007), la cobertura del muñón con PTFE, la inversión del endotelio del muñón o más recientemente técnicas de

avulsión que permitan minimizar la incisión y el abordaje inguinal (Kokubo *et al.*, 2018). La fuerza de recomendación de estas técnicas es baja (Howard *et al.*, 2009).

Por otro lado, todos estos complejos procesos que desarrollan la recidiva inguinal varicosa lo hacen dentro del microuniverso alternativo cicatricial con la interacción orquestada de un sin número de fenómenos biomoleculares (hipoxia, inflamación y angiogénesis) y físico-químicos que transmiten señales electroquímicas entre célula y célula, y la matriz extracelular dentro de una complicada ingeniería reparativa tisular.

Hemos enfocado nuestro estudio hacia marcadores implicados en los procesos neoangiogénicos, como HIF, Endoglina y VEGF y sus receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 tanto para el grupo de pacientes aquejados de varices esenciales, donde la enfermedad es primaria, como en un segundo grupo de pacientes con neocayado angiogénico. Éstos últimos fueron seleccionados tras realizar un estudio mediante ecodoppler y utilizando como criterio de confirmación los hallazgos intraoperatorios que permiten al cirujano diagnosticarlo, teniendo en cuenta la tortuosidad e irregularidad anatómica y la fragilidad parietal de dichos vasos inmersos en un magma fibroso. La neovascularización en la zona cicatricial de la ligadura de la unión safeno-femoral y la extracción del tronco safeno, forma nuevos vasos que se reconectan con troncos venosos residuales. En otros términos, la desconexión venosa en un entorno cicatricial hipóxico induce la activación endotelial y la liberación de factores angiogénicos que producen recanalización y endotelización del trayecto anatómico de la vena reseca. El mantenimiento de la señal angiogénica y la persistencia de factores proangiogénicos, conducirían a la aparición de ese ovillo de neovasos que se conectan con el muñón venoso safeno, la vena femoral común y sus colaterales.

Intentamos utilizar como grupo control pacientes con venas sanas procedentes de ramas colaterales de la unión safenofemoral biopsiadas en los abordajes de pacientes diagnosticados de aneurisma de aorta en quien se realizó tratamiento endovascular. La distribución diferente por sexos (mayoritamente masculino) y edades (más edad), la también diferente clasificación ASA y la necesidad de antiagregación postoperatoria limitaba su valor referencial como grupo control por lo que, finalmente, fue desestimado para ese fin.

A todos los pacientes reclutados en este estudio se les ha indicado profilaxis ETEV con heparina de bajo peso molecular de forma sistemática durante una semana hasta retirar el vendaje compresivo en atención primaria. Las recomendaciones de profilaxis de ETEV para la cirugía de varices aconsejan su personalización y se aconseja especialmente en pacientes con varices primarias que han presentado flebitis previa y en situaciones de especial inmovilidad entre otras circunstancias (Hill *et al.*, 2007). En igual dirección, otras guías consideran la cirugía de varices de bajo riesgo trombótico pero no hay

recomendaciones específicas las para reintervenciones de la unión safenofemoral donde el traumatismo quirúrgico y la duración de la intervención es más prolongada. Por ello, y de manera consensuada, la decisión de indicar HBPM fue sistemática y no electiva y la indicamos de manera sistemática para ambos grupos en un intento de reducir los sesgos.

La heparina además de efectos anticoagulantes y profibrinolíticos presenta efectos pleiotrópicos antiinflamatorios, anticomplementémicos, antifibróticos y antimetastásicos, porque puede interactuar con un amplio rango de proteínas. Se une a citoquinas y proteínas de fase aguda y las neutraliza en el sitio de la inflamación, disminuyendo los niveles de interleuquinas (IL) 6 y 8, TNF y proteína C reactiva (PCR). La heparina se une a la selectina P e inhibe la adhesión de leucocitos y neutrófilos a las células endoteliales, y de esa manera previene la liberación de radicales de oxígeno y enzimas proteolíticas. Igualmente presenta un efecto antiangiogénico al interaccionar con factores de crecimiento como el VEGF, el factor de crecimiento derivado de los fibroblastos (FGF), factor de crecimiento transformante (TGF), y como la proteína morfogénica del hueso (Scazziota et al 2017).

La Endoglina es una glicoproteína de membrana, expresada en las células endoteliales que modula las respuestas celulares al TGF- $\beta$ , incluida la regulación de la angiogénesis, la producción de matriz extracelular y mantenimiento de la integridad de la pared y su remodelación en el desarrollo cardiovascular. Como molécula proangiogénica es determinante para que la angiogénesis se desarrolle correctamente. Además, el procesamiento proteolítico de esta isoforma de membrana genera endoglina soluble (sEng) detectable en el plasma. Un aumento en la expresión de endoglina es necesario para el correcto desarrollo del proceso angiogénico, y alternativamente una disminución en su expresión es necesaria para que la angiogénesis pueda resolverse correctamente (Ollauri-Ibañez 2017). El papel de la Endoglina (y su forma soluble) no han sido estudiados en la enfermedad varicosa y su recurrencia

Nos planteábamos si tras la desconexión venosa la respuesta en ese subgrupo de pacientes con recidivas de cayado, la persistencia de la expresión elevada de endoglina respecto a los pacientes con diagnóstico de enfermedad primaria, daría lugar a un exceso de angiogénesis con reconexión y aparición de la recidiva, y así determinar la expresión de Endoglina soluble (sEng) en el seguimiento para identificar subgrupos de pacientes con predisposición a desarrollarla. Buscábamos un potencial impacto clínico en el que los resultados positivos de la Endoglina en los tejidos se confirmasen con resultados similares para la endoglina soluble (sEng) en plasma y poder así convertirse en un marcador predictivo de recurrencia varicosa y poder así influir en su evolución. Sin embargo, no hemos podido confirmar una correlación cuantitativa entre las dos formas de Endoglina.

En las determinaciones mediante qPCR de la expresión génica en el tejido biopsiado, no hemos encontrado diferencias en la expresión de HIF ni inter ni intragrupal (ni entre PVV ni RVV, ni entre determinaciones proximales o distales). En cambio, en el caso de Endoglina y VEGF, en ambos se observa una sobreexpresión significativa (en mayor medida para VEGF) en las muestras de tejido del neocayado respecto a los pacientes con varices primarias y tales cambios no se ha confirmado en la comparativa para muestras distales. Para VEGFR-1 y VEGFR-2 ambos se sobreexpresan en el grupo de varices recidivadas respecto a los pacientes con varices primarias tanto en las muestras proximales como distales.

Estos datos parecen confirmar que en las recidivas existe un proceso angiogénico que se prolonga y mantiene activo o mal resuelto sin que esté necesariamente inducido por la hipoxia.

Al comparar los datos de las muestras proximales y distales, los niveles de los marcadores son algo más elevados en las muestras proximales que en las distales en el grupo de las recidivas, hallazgo que no se confirma en el grupo de las varices primarias pero es una tendencia que solo alcanza significación para VEGFR-1.

Más sorprendente resulta la mayor expresión de los receptores de VEGF en las muestras obtenidas de venas distales en el grupo de recidivas respecto al grupo de varices primarias. No hemos encontrado datos concluyentes en la literatura que nos permitan orientar tales hallazgos. La relación en la señalización de VEGF en las venas varicosas ya era conocida (Hollingsworth et al 2004). Más recientemente se ha planteado una posible sobreexpresión de VEGF y de la metaloproteinasa de la matriz-9 (MMP-9) en el remodelado de la matriz extracelular de las venas varicosas (Horecka *et al.*, 2021). Nos planteamos si tal remodelado pudiese ser más activo en el grupo de varices recidivadas debiendo profundizar en el futuro en este aspecto.

En cuanto a las determinaciones absolutas en la secreción de factores solubles en suero, para sEng y VEGF, no se han evidenciado diferencias en la expresión entre ambos grupos ni pre ni postoperatorias. Nuestro planteamiento de que la angiogénesis se hubiese mantenido prolongadamente en el grupo de recidivas y de que pudiesen detectarse niveles elevados de sEng en esos pacientes, no se ha visto confirmado, pese a haber evidenciado la diferencia significativa de Endoglina en las muestras de tejido de la recidiva del cayado.

El estudio de VEGFR-1 y VEGFR-2 confirmó una expresión significativamente menor de VEGFR-1 en la determinación preoperatoria en el grupo de varices recidivadas, sin confirmarse diferencias en la expresión de VEGFR-2. Tampoco se encontraron diferencias en los receptores en el grupo de varices primarias.

A los 3 meses se observó una tendencia a un incremento mantenido de ambos marcadores que en el caso de las varices primarias resultó significativo para VEGFR-1 y no lo fue para VEGFR-2 (nos planteamos si pudo haber algún defecto en el procesamiento y también fue significativo para ambos receptores en el grupo de las recidivadas (RVV)).

Mientras que VEGF es considerado el principal factor soluble angiogénico, los tres restantes pueden ser antiangiogénicos puesto que pueden actuar secuestrando el VEGF circulante (o el TGF $\beta$ /BMP en el caso de la Endogлина) reduciendo sus niveles circulantes y su actividad. En consonancia con esto, nuestros resultados muestran que los niveles de VEGFR-1 soluble son menores en el grupo de recidivas (RVV) que en grupo de varices primarias (PVV) lo que reforzaría la presencia de un proceso angiogénico activo y la falta de detección de niveles elevados de VEGF pudiese sugerir que dicho proceso no es sistémico y no eleva la producción de VEGF manera detectable.

De confirmarse con nuevos estudios, la menor expresión de VEGFR-1 plantea un desequilibrio entre los factores angiogénicos y antiangiogénicos, y podría ser útil, como marcador de riesgo de recidiva inguinal. Hasta ahora la utilidad clínica de sVEGFR-1 se había planteado contrariamente para monitorizar el embarazo y evaluar con su incremento la gravedad de la enfermedad hipertensiva y el riesgo de la eclampsia (Tripathi *et al.*, 2004).

En el análisis de los niveles de los factores solubles tras la intervención quirúrgica, las diferencias observadas desaparecían y los niveles entre ambos grupos de pacientes eran similares, aunque siempre levemente superiores a los pre-operatorios. Esta transversalidad del efecto (siempre mayor en los 3 meses, aunque no siempre significativo), y su pequeña magnitud nos hace creer que pudiese deberse a una cierta dilución de la sangre en el momento del muestreo, coincidente con el ingreso y el aporte de sueros que reducirían la concentración de los factores a medir. Sin embargo, tras los 3 meses la muestra es obtenida por venopunción en consulta, sin aporte de suero, por lo que las concentraciones podrían ser más elevadas,

Cuando las determinaciones se correlacionaron con el grado de expresión clínica de la enfermedad varicosa, estratificando los pacientes según CEAPC con independencia de si eran del grupo de varices primarias o recidivadas, la tendencia mayoritaria en los resultados fue la ausencia de diferencias significativas. No se observaron diferencias ni en la expresión de genes, ni a nivel proximal ni distal, ni respectivamente tampoco en los factores solubles entre los diferentes CEAP.

Cuando el análisis CEAPC se hizo separadamente por grupos, en el análisis del grupo de recidivas (RVV) el grado de expresión clínica de la enfermedad no mostró correlación con los marcadores angiogénicos. Sin embargo en el grupo de varices primarias (PVV) en los grados menos evolucionados (CEAPC2) se evidenció sobreexpresión llamativa de endogлина soluble respecto a los de mayor afectación clínica (CEAPC3/4/5). Su interpretación por ser un hallazgo aislado en el grupo PVV y en una tendencia de ausencia de significación para el resto de marcadores y de análisis combinados no creemos que deba orientarse hacia una respuesta angiogénica y nos permite hipotetizar que pudiese estar relacionado con una mayor actividad de las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) en las fases más precoces de la enfermedad. Las MMPs son responsables de fragmentar la endogлина de membrana para generar la soluble y quizá en las fases más evolucionadas de la enfermedad pudiesen tener una menor actividad y por ende producirse menos sEng, pudiendo así actuar como marcador de progresión clínica.

Desde el punto de vista de la intervención, la evidencia disponible en el presente para la indicación de medicación oral en IVC, concluye que los flebotónicos no parecen alterar el curso de la enfermedad, concluyendo que sólo presentan evidencia de certeza moderada en su utilidad para reducir el edema distal (Martinez-Zapata *et al.*, 2020).

Con un enfoque innovador se ha observado como el tratamiento con medias compresivas tienen alternativamente al efecto físico-mecánico en las paredes de las venas varicosas, efectos a nivel molecular pudiendo la presoterapia modificar la proteómica de la EVC evolucionada en los pacientes aquejados úlcera venosa lo que abre la puerta a futuras investigaciones en esa dirección (Moñux G *et al.*, 2021).

Hay varias limitaciones en este estudio. En primer lugar, la limitación en el número de pacientes reclutados se explica por la reducción de las intervenciones quirúrgicas durante la pandemia COVID-19, circunstancias extraordinarias que modificaron las previsiones. En segundo lugar, carecer de un grupo control homogéneo de pacientes sin varices. En tercer lugar, el número limitado de moléculas analizadas está motivado por problemas de costos; hemos seleccionado aquellos no investigados previamente (Eng), y otros que, aunque ya investigados, son estándares de referencia (VEGF o HIF). Cuarto, que metodológicamente no es posible realizar un estudio aleatorizado, aunque los análisis biológicos de las muestras hayan sido ciegos.





**CONCLUSIONES**



## VI. CONCLUSIONES.

### Determinaciones tisulares:

1. No hay diferencias en la expresión génica de HIF-1 $\alpha$  entre grupos (varices primarias o recidivadas) tanto en las biopsias de localización proximal en unión safenofemoral, como en las determinaciones distales.
2. Existe una mayor expresión génica de marcadores proangiogénicos (endoglina y VEGF y sus receptores VEGFR-1 Y VEGFR-2) en las muestras con neocayado, respecto de las muestras del cayado safeno-femoral de los pacientes con varices primarias, o en las procedentes de la zona distal.

### Determinaciones séricas:

3. No se observan diferencias en los niveles séricos de endoglina, VEGF y su receptor VEGFR2 entre el grupo de pacientes con recidiva y el de varices primarias, ni preoperatoria ni postoperatoriamente a los tres meses.
4. Los niveles séricos preoperatorios de la forma soluble del receptor VEGFR1, con propiedades antiangiogénicas, son inferiores en el grupo de varices recidivadas que respecto del grupo de varices primarias.

### Análisis CEAP:

5. Los grados clínicos C de la clasificación CEAP, no están relacionados con la expresión de los genes o la secreción de los factores solubles estudiados.
6. De forma aislada, en el grupo con varices primarias se observa que los pacientes C2 presentan mayores niveles de endoglina sérica respecto del resto de grados "C".

Conclusiones finales

7. La mayor expresión de marcadores angiogénicos en la zona del neocayado indica la presencia de una angiogénesis persistente independiente de la hipoxia, dada la ausencia de sobreexpresión de HIF-1 $\alpha$ .
8. No parece que los niveles de endoglina soluble sean útiles como biomarcador para el desarrollo de la recidiva, sin embargo, pudiese plantearse como marcador del desarrollo de la enfermedad en pacientes con varices primarias.

## **BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFÍA

1. Allegra C, Antignani PL, Carlizza A. Recurrent varicose veins following surgical treatment: our experience with five years follow-up. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2007; 33:751-6. DOI: 10.1016/j.ejvs.2006.12.020.
2. Almeida JI, Kaufman J, Gockerite O, Chopra P, Martin TE, Hoheim DF, et al. Radiofrequency endovenous Closura FAST versus laser ablation for the treatment of great saphenous vein reflux: a multicenter single blinded randomized study (RECOVERY study). *J Vasc Inter Radiol.*2009; 20: 732-739. DOI: 10.1016/j.jvir.2009.03.008.
3. Álvarez LJ, Lozano F, Marinello J, Masegosa JA. Encuesta epidemiológica sobre la insuficiencia venosa en España: estudio DETECT-IVC 2006. *Angiología* 2008; 60: 27-36.
4. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* 2008; 22(10): 1276–312. DOI:10.1101/gad.1653708.
5. Anning ST. Historical aspects in Dodd H Cockett FB (ed.). *The pathophysiology and Surgery of veins of the lower limb* Edimburgh Livinstone 1956
6. Ardelean DS, Yin M, Jerkic M, Peter M, Ngan B, Kerbel RS, et al. Anti-VEGF therapy reduces intestinal inflammation in Endoglin heterozygous mice subjected to experimental colitis. *Angiogenesis* 2014; 17(3): 641–659. DOI: 10.1007/s10456-014-9421-x.
7. Aristorena M, Blanco FJ, de Las Casas-Engel M, Ojeda-Fernández L, Gallardo-Vara E, Corbi A, et al. Expression of endoglin isoforms in the myeloid lineage and their role during aging and macrophage polarization. *J Cell Sci.* 2014; 127:2723–2735. DOI: 10.1242/jcs.143644.
8. Amoldi CC. Venous pressures in the leg of healthy human subjects at rest and during muscular exercise. *Acta Chir Scand.*1965; 130:570-83.

9. Arthur HM, Ure J, Smith AJ, Renforth G, Wilson DI, Torsney E, et al. Endoglin, an ancillary TGFbeta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Dev Biol.* 2000; 217(1): 42–53. DOI: 10.1006/dbio.1999.9534.
10. Atta HM. Varicose veins: role of mechanotransduction of venous Hypertension. *Int J Vasc Med.* 2012; 2012:538627. DOI: 10.1155/2012/538627.
11. Augustin HG, Young Koh G, Thurston G, Alitalo K. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin–Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009; Mar; 10(3):165-77. DOI: 10.1038/nrm2639.
12. Babcock WW. *New York Medical J* 1907; 86:153-156.
13. Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest.* 1973; 52(3): 741-4. DOI: 10.1172/JCI107236.
14. Badier-Commander C, Couvelard A, Henin D, Verbeuren T, Michel J-B, Jacob MP. Smooth muscle cell modulation and cytokine overproduction in varicose veins: An in situ study. *J Pathol.* 2001; 193:398-407. DOI: 10.1002/path.819.
15. Badier-Commander C, Verbeuren T, Lebard C, Michel JB, Jacob MP: Increased TIMP/MMP ratio in varicose veins: a possible explanation for extracellular matrix accumulation. *J Pathol* 2000, 192(1):105–112. DOI: 10.1002/1096-9896(2000)9999:9999<:AID-PATH670>3.0.CO; 2-1.
16. Baffert F, Le T, Sennino B, Thurston G, Kuo CJ, Hu-Lowe D, et al. Cellular changes in normal blood capillaries undergoing regression after inhibition of VEGF signaling. *Am J Physiol. Heart Circ Physiol.* 2006; 290(2): H547–H559. DOI: 10.1152/ajpheart.00616.2005.
17. Bagley RG, Weber W, Rouleau C, Teicher BA . Pericytes and endothelial precursor cells: cellular interactions and contributions to malignancy. *Cancer Res.* 2005; 65:9741–9750. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-4337.



18. Barber RF, Shatara FI. The varicose disease. *NY State J Med*, 1925; 31:574-80.
19. Barnett JM, Suarez S, McCollum GW, Penn JS. Endoglin promotes angiogenesis in cell- and animal-based models of retinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.2014; 55(10): 6490–6498. DOI: 10.1167/iovs.14-14945.
20. Basain JM, Valdes MC, Miyar E, Perez M, Duany D, Alfonso M. Factor inducible por hipoxia como hipoxia como mecanismo molecular regulador de la homeostasis del oxígeno y su respuesta ante la hipoxia a nivel celular en la obesidad. *Panorama Cuba y Salud* 2017; 12(3): 66-73.
21. Basu RK, Hubchak S, Hayashida T, Runyan CE, Schumacker PT, Schnaper HW. Interdependence of HIF-1alpha and TGF-beta/Smad3 signaling in normoxic and hypoxic renal epithelial cell collagen expression. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011; 300: F898-905. DOI: 10.1152/ajprenal.00335.2010.
22. Beecher H, Field ME, Krogh A. The Effect of Walking on the Venous Pressure at the Ankle. *Acta Physiologica*1936; 73(1):134-141. DOI:10.1111/J.1748-1716.1936. TB01458.x.
23. Bellon T, Corbi A, Lastres P, Calés C, Cebrián M, Vera S, et al. Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur J Immunol*. 1993; 23:2340–2345. DOI: 10.1002/eji.1830230943.
24. Bergan JJ, Pascarella L, Schmid-Schönbein GW. Pathogenesis of primary chronic venous disease: Insights from animal models of venous hypertension. *J Vasc Surg*. 2008; 47(1):183-92. DOI: 10.1016/j.jvs.2007.09.028.
25. Bergan JJ, Schmid-Schönbein, GW, Coleridge Smith PD, Nicolaides AN, Boisseau MR, Eklof B. Mechanisms of Disease Chronic Venous Disease. *N Engl J Med*. 2006; 355(5):488-98. DOI: 10.1056/NEJMra055289.
26. Birdina J, Pilmane M, Ligers A. The morphofunctional changes in the wall of varicose veins. *Ann Vasc Surg*. 2017; 42:274-84. DOI: 10.1016/j.avsg.2016.10.064.

27. Bishop PN. The role of extracellular matrix in retinal vascular development and preretinal neovascularization. *Exp Eye Res.* 2015; 133: 30–36. DOI: 10.1016/j.exer.2014.10.021.
28. Blalock A. Oxygen content of blood in patients with varicose veins. *Arch Surg.* 1929; 19:898–905, DOI:10.1001/archsurg.1929.01150050129010.
29. Blancas AA, Lauer NE, McCloskey KE. Endothelial differentiation of embryonic stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol.* 2008; Chapter 1: Unit 1F.5 DOI:10.1002/9780470151808.sc01f05s6.
30. Blanco FJ, Grande MT, Langa C, Oujo B, Velasco S, Rodríguez-Barbero A, et al. S-endoglin expression is induced in senescent endothelial cells and contributes to vascular pathology. *Circ Res.* 2008; 103:1383–1392. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.176552.
31. Blanco R, Gerhardt H. VEGF and Notch in tip and stalk cell selection. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2013; 3(1). DOI: 10.1101/cshperspect.a006569.
32. Bone Salat C. Tratamiento endoluminal de las varices con láser diodo. Estudio preliminar. *Revista de la Patología Vascul* 1999; 1:31-39.
33. Botella LM, Albiñana V, Ojeda-Fernandez L, Recio-Poveda L, Bernabeu C. Research on potential biomarkers in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Front Genet.* 2015; 6:115. 0089927. DOI: 10.3389/fgene.2015.00115.
34. Bourdeau A, Dumont DJ, Letarte M. A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest.*1999; 104: 1343-135. DOI: 10.1172/JCI8088.
35. Bradshaw RA. Stahl PA *Encyclopedia of Cell Biology vol I Molecular cell Biology USA:* Academic Press Elsevier 2016 1st ed.; 694-9.
36. Brake M, Lim CS, Shepherd AC, Shalhoub J, Davies AH. Pathogenesis and etiology of recurrent varicose veins. *J Vasc Surg.* 2013; 57(3):860-8. DOI: 10.1016/j.jvs.2012.10.102.

37. Brodie BC Lectures illustrative of various Subjects in Pathology and Surgery Longman, Brown, Green and Longmans. London 1846.
38. Browse NL, Burnand KG, Thomas ML Diseases of the veins London Edward Arnold 1988 Pp 674 1. DOI:10.1002/bjs.1800760656.
39. Browse NL, Burnand KG. The cause of venous ulceration. *Lancet* 1982; 2:243–245. DOI: 10.1016/s0140-6736(82)90325-7.
40. Bruczko M, Wolańska M, Małkowski A, Sobolewski K, Kowalewski R. Evaluation of Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptors in Human Neointima. *Pathobiology* 2016; 83:47–52. DOI: 10.1159/000442885.
41. Buhning HJ, Muller CA, Letarte M, Gougos A, Saalmulle, A, van Agthoven A, et al. Endoglin is expressed on a subpopulation of immature erythroid cells of normal human bone marrow. *Leukemia* 1991; 5(10): 841–847.
42. Burnand KG, Whimster I, Clemenson G, Thomas ML, Browse NL. The relationship between the number of capillaries in the skin of the venous ulcer-bearing area of the lower leg and the fall in foot vein pressure during exercise. *Br J Surg.* 1981; 68::297–300. DOI: 10.1002/bjs.1800680502.
43. Caggiati A, Bergan J, Gloviczki P, Jantet G, Wendell- Smith C, Partsch H. Nomenclature of the veins of the lower limbs: an international interdisciplinary consensus statement. *J Vasc Surg.* 2002; Aug; 36 (2):416-22. DOI: 10.1067/mva.2002.125847.
44. Cao Y, Chen H, Zhou L, Chiang MK, Anand-Apte B, Weatherbee JA, et al. Heterodimers of placenta growth factor/VEGF: endothelial activity, tumor cell expression and high affinity binding to Flk-1/KDR. *J Biol Chem.* 1996; 271: 3154-3162. DOI: 10.1074/jbc.271.6.3154.
45. Caramelo C, Álvarez MV, Castilla MA, Yagüe S, Peña-Deudero JJ, González FR, et al. Papel del VEGF en la respuesta celular a la agresión. *Revista de Nefrología* 2003; 23: 1-61.

46. Caramelo C, Peña-Deudero JJ, Castilla MA, Justo S, De Solis, AJ Neira et al. Respuesta a la hipoxia. Un mecanismo sistémico basado en el control de la expresión génica *Medicina (Buenos Aires)* 2006; 66: 155-164.
47. Carandina S, Mari C, De Palma M, Marcellino MG, Cisno C, Legnaro A, et al. Varicose vein stripping vs haemodynamic correction (CHIVA): a long term randomised trial. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2008; 35(2):230-7. DOI: 10.1016/j.ejvs.2007.09.011.
48. Cario-Toumaniantz C, Boularan C, Schurgers LJ, Heymann MF, Le Cunff M, Léger J, et al. Identification of differentially expressed genes in human varicose veins: involvement of matrix gla protein in extracellular matrix remodeling *J Vasc Res.* 2007;44(6):444-59. DOI: 10.1159/000106189.
49. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996; 380(6573):435-9. DOI: 10.1038/380435a0.
50. Carmeliet P, Collen D. Molecular Basis on Angiogenesis: Role of VEGF and VE Cadherin. *Ann NY Acad Scis.* 2006; 902: 249-264. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06320.x.
51. Castonguay R, Werner ED, Matthews RG, Presman E, Mulivor, AW, Solban, N, et al. Soluble endoglin specifically binds bone morphogenetic proteins 9 and 10 via its orphan domain, inhibits blood vessel formation, and suppresses tumor growth. *J Biol Chem.* 2011; 0 286(34): 30034–30046. DOI: 10.1074/jbc.M111.260133.
52. Celsus AC: *Of Medicine (in Eight Books)* Grieve J trans London Willson and Durham 1756
53. Chandler JG, Pichot O, Sessa C, Schuller-Petrovic S, Osse FJ, Bergan JJ. Defining the role of extended saphenofemoral junction ligation: a prospective comparative study. *J Vasc Surg.* 2000; 32: 941-53; DOI: 10.1067/mva.2000.110348.
54. Chang SL, Huang YL, Lee MC, Hu S, Hsiao YC, Chang SW, et al. Association of Varicose Veins with incident Venous Thromboembolism and Peripheral Artery Disease. *JAMA* 2018; 319(8):807-817. DOI:10.1001/jama.2018.0246.

55. Chappel JC, Gluceru JC, Nesmith JE, Mouillesseaux KP, Bradley VB, Hartland CM, et al. Flt-1 (VEGFR-1) coordinates discrete stages of blood vessel formation. *Cardiovasc Res*. 2016 Jul 1; 111(1):84-93. DOI: 10.1093/cvr/cvw091.
56. Chappell JC, Wiley DM, Bautch VL. Regulation of blood vessel sprouting. *Semin Cell Dev Biol*. 2011 22(9):1005-11. DOI 10.1016/j.semcdb.2011.10.006.
57. Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J, et al. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem*. 1992; 267:19027–19030.
58. Chen PS, Chen LS, Cao JM, Sharifi B, Karagueuzian HS, Fishbein MC. Sympathetic nerve sprouting, electrical remodeling and the mechanisms of sudden cardiac death. *Cardiovasc Res*. 2001; 50(2):409-416. DOI: 10.1016/s0008-6363(00)00308-4.
59. Chen Y, Amende I, Hampton TG, Yang Y, Ke Q, Min JY et al. Vascular endothelial growth factor promotes cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 291(4):H1653-8. DOI: 10.1152/ajpheart.00363.2005.
60. Cheng GC, Libby P, Grodzinsky AJ, Lee RT. Induction of DNA synthesis by a single transient mechanical stimulus of human vascular smooth muscle cells. Role of fibroblast growth factor-2. *Circulation*. 1996; 93(1):99–105. DOI: 10.1161/01.cir.93.1.99.
61. Chim H, Armijo BS, Miller E, Gliniak C, Serret MA, Gosain AK. Propranolol induces regression of hemangioma cells through HIF-1alpha-mediated inhibition of VEGF-A. *Ann Surg*. 2012; 256(1):146-156. DOI: 10.1097/SLA.0b013e318254ce7a.
62. Clauss M. Functions of VEGF receptor-1 (FLT-1) in the vasculature. *Trends Cardiovasc Med*. 1998; 8: 241-245. DOI: 10.1016/s1050-1738(98)00015-2.
63. Cockett FB, Jones DE. The ankle blow out syndrome. A new approach of the varicose ulcer problem. *Lancet* 1953;1:17-23. DOI: 10.1016/s0140-6736(53)92512-4.

64. Coleridge Smith PD, Thomas P, Scurr JH, Dormandy JA. Causes of venous ulceration: a new hypothesis. *Br Med J. (Clin Res Ed)*. 1988; 296:1726–1727. DOI: 10.1136/bmj.296.6638.1726.
65. Conley B, Smith J, Guerrero-Esteo M, Bernabeu C, Vary C. Endoglin, a TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 2000; 153(2): 323–335. DOI: 10.1016/s0021-9150(00)00422-6.
66. Conley BA, Koleva R, Smith JD, Kacer D, Zhang D, Bernabéu C, et al. Endoglin controls cell migration and composition of focal adhesions: Function of the cytosolic domain. *J Biol Chem*. 2004; 279(26): 27440–27449. DOI:10.1074/jbc.M312561200.
67. Cook DB, McLucas BC, Montoya LA, Chris M. Brotski CM ShelleyDas et al. Multiplexing protein and gene level measurements on a single Luminex platform. *Methods* 2019; 58, 1:27-32. Doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.01.018.
68. Corcos L, De Anna D, Zamboni P, Gasbarro V, Bresadola V, Procacci T, et al. Reparative surgery of the valves in the treatment of de superficial venous insufficiency. External banding valvuloplasty versus high ligation or disconnection. A prospective multicentric trial. *J Mal Vasc*.1997; 22(2): 128-136.
69. Cornu-Thenard A, Boivin P, Baud JM, De Vincenzi I, Carpentier PH. Importance of familiar factor in varicous disease: clinical study of 134 families. *J Dermatol Surg Oncol*. 1994; 20: 318-26. DOI: 10.1111/j.1524-4725.1994.tb01631.x.
70. Creton D. A nondraining saphenous system is a factor of poor prognosis for long-term results in surgery of great saphenous vein recurrences. *Dermatol Surg*. 2004; 30:744-9. DOI: 10.1111/j.1524-4725.2004.30211.x.
71. Critchley G, Handa A, Maw A, Harvey A, Harvey MR, Corbett CR. Complications of varicose vein surgery. *Ann R Coll Surg Engl* 1997; 79:105– 10.
72. Darke SG. The morphology of recurrent varicose veins. *Eur J Vasc Surg*. 1992; 6:512-7. DOI: 10.1016/s0950-821x (05)80626-7.

73. Darland DC, Massingham LJ, Smith SR, Piek E, Saint-Geniez M, D'Amore PA. Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation-dependent and is associated with endothelial survival. *Dev Biol.* 2003 Dec 1; 264(1):275-88. DOI: 10.1016/j.ydbio.2003.08.015.
74. David L, Feige JJ, Bailly S. Emerging role of bone morphogenetic proteins in angiogenesis. *Cytokine & Growth Factor Rev.* 2009; 20(3):203–212.
75. Davis DD. An essay on the proximate cause of the disease called phlegmasia dolens. *Med Chir Trans* 1822; 12: 419 -572. DOI: 10.1177/09595287230120p215.
76. De Bandt M, Ben Mahdi MH, Ollivier V, Grossin M, Dupuis M, Gaudry M, et al. Blockade of vascular endothelial growth factor receptor I (VEGF-RI), but not VEGF-RII, suppresses joint destruction in the K/BxN model of rheumatoid arthritis. *J Immunol.* 2003; 171:4853–4859. DOI: 10.4049/jimmunol.171.9.4853.
77. De Maeseneer MG, Philipsen TE, Vandenbroeck CP, Lauwers PR, Hendriks JM, De Hert SG, et al. Closure of the cribiform fascia: an efficient anatomical barrier against postoperative neovascularization at the saphenofemoral junction. A prospective study. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2007; 34: 361-66. DOI: 10.1016/j.ejvs.2007.03.020.
78. De Maeseneer MG. The role of postoperative neovascularisation in recurrence of varicose veins: from historical background to today's evidence. *Acta Chir Belg.* 2004; 104:283-9. DOI: 10.1080/00015458.2004.11679555.
79. Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci.* 2008; 121 (Pt 13):2115-22. DOI: 10.1242/jcs.017897.
80. Del Río L, Aceves M, Dueñas AI, González-Fajardo JA, Vaquero C, Crespo MS, et al. Varicose veins show enhanced chemokine expression. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2009; 8(5):635-41. DOI: 10.1016/j.ejvs.2009.07.021.

81. Deudero JJ, Caramelo C, Castellanos MC, Neria F, Fernández-Sánchez R, Calabia O, et al. Induction of hypoxia-inducible factor 1alpha gene expression by vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 2008 (25); 283(17):11435-44. DOI: 10.1074/jbc.M703875200.
82. Dikov MM, Ohm JE, Ray N, Tchekneva EE, Burlison J, Moghanaki D, et al. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in dendritic cell differentiation. *J Immunol.* 2005; 174:215–22. DOI: 10.4049/jimmunol.174.1.215.
83. Dueñas Pousa I. Análisis de los factores solubles angiogénicos en la enfermedad de Crohn. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. 2009
84. Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J*, 2003; 17:984-92. DOI: 10.1096/fj.02-0634rev.
85. Egan B, Donnelly M, Bresnihan M, Tierney S, Feeley M. Neovascularization: an “innocent bystander” in recurrent varicose veins. *J Vasc Surg.* 2006; 44:1279-84. DOI: 10.1016/j.jvs.2006.08.017.
86. Ehrler M, Heim D, Mouton WG. Histopathology of neovascularization observed during saphenofemoral re-do high ligation. *EJVES Vasc Forum.* 2021;17-9. DOI: 10.1016/j.ejvsf.2021.06.005. ECollection 2021.
87. Eilken HM, Adams RH. Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* 2010;22(5):617-25. DOI: 10.1016/j.ceb.2010.08.010.
88. Eklöf B, Rutherford RB, Bergan JJ, Carpentier PH, Gloviczki P, Kistner RL, et al. Revision of the CEAP classification for chronic venous disorders: consensus statement. *J Vasc Surg.* 2004; 40(6):1248-52. DOI: 10.1016/j.jvs.2004.09.027.
89. El Wajeh Y, Giannoukas AD, Gulliford CJ, Suvarna SK, Chan P. Saphenofemoral venous channels associated with recurrent varicose veins are not neovascular. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2004; 28:590-4. DOI: 10.1016/j.ejvs.2004.09.011.



90. Faber JE, Zhang H, Lassance-Soares RM, Prabhakar P, Najafi A, Burnett MS, et al. Aging causes collateral rarefaction and increased severity of ischemic injury in multiple tissues. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31:1748–56. DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.227314.
91. Fabricius de Aquapendente. *Anatomici Patavini de Venarum Osmolis.* In Laufman H ed. *The Veins* Austin Silvergirl 1986 p 14.
92. Farah MH, Nayfeh T, Urtecho M, Hasan B, Amin M, Sen I, et al. A systematic review supporting the Society for Vascular Surgery, the American Venous Forum, and the American Vein and Lymphatic Society guidelines on the management of varicose veins. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord.* 2021:S2213-333X (21)00421-2. DOI: 10.1016/j.jvsv.2021.08.011.
93. Fernández-Ruiz E, St-Jacques S, Bellón T, Letarte M, Bemabeu C. Assignment of the human endoglin gene (End) to 9q34→qter. *Cytogenetic Cell Genet.* 1993; 64(3–4): 204–207. DOI: 10.1159/000133576.
94. Ferrara N, Davis Smyth T. The biology of VEGF. *Endocr Rev.* 1997; 18(1):4-25. DOI: 10.1210/edrv.18.1.0287.
95. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.* 1997; 18: 4–25. DOI: 10.1210/edrv.18.1.0287.
96. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors *Nat Med.* 2003; 9(6):669-76. DOI: 10.1038/nm0603-669.
97. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; 161(2): 851–858. DOI: 10.1016/0006-291x (89)92678-8.
98. Fischer R, Chandler JC, De Maeseneer M, Rings N, Levfebre M, Earnshaw J, et al. Bergan JJ, Duff C, Linde N. The unresolved problema of recurrent saphenofemoral reflux. *J Am Coll Surg.* 2002 195(1) 80-94.

99. Flórez A, De Haro J, Bleda S, Varela C, Esparza I, Acín F. Analysis of vascular endothelial growth factor gene expression in the tissues of patients with chronic venous insufficiency. *Phlebology* 2013; 28(1): 32–37. DOI 10.1258/phleb.2011.011102.
100. Fonsatti E, Del Vecchio L, Altomonte M, Sigalotti L, Nicotra MR, Coral S, et al. An accessory component of the TGF-beta-binding receptor-complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies. *J Cell Physiol*, 2001; 188: 1-7. DOI: 10.1002/jcp.1095.
101. Fonsatti E, Del Vecchio L, Altomonte M, Sigalotti L, Nicotra MR, Coral S, et al. Endoglin: An accessory component of the TGF- $\beta$ -binding receptor-complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies. *J Cell Physiol*. 2001; 188::1–7. DOI: 10.1002/jcp.1095.
102. Franceschi C. Theorie et pratique de la cure conservatrice de l'Insuffisance veineuse en ambulatoire patients. Précy sous Thil: Editions de l'Armaçon 1988. ISBN: 978-2-906594-06-7.
103. Frías MO, García O, Vázquez N, Rial R, Carrasco E, Moñux G, et al. Documento de consenso de la Sociedad Española de Médicos de Atención Primaria y Capítulo Español de Flebología y Linfología de la Sociedad Española de Angiología y Cirugía Vascular: trombosis venosa superficial de miembros inferiores en Atención Primaria. Grupo de Trabajo de Vasculopatías de SEMERGEN. *Medicina de Familia. SEMERGEN* 2019; 45 (3): 187-196 .DOI:10.1016/j.semerg.2018.08.006.
104. Friedenwald H. Amatus Lusitanuss *Bull Inst Hist Med*. 1937; 5:644.
105. Frings N, Glowacki P, Nelle A, Van-Thanh-Phuong T. Prospective study of avoiding neoangiogenesis after great saphenous vein crosssection. Initial results. *Zentralbl Chir*. 2001; 126:528-30. DOI: 10.1055/s-2001-16271.
106. Fujimoto N, Hastings JL, Bhella PS, Shibata S, Gandhi NK, Carrick-Ranson G, et al. Effect of ageing on left ventricular compliance and distensibility in healthy sedentary humans *J Physiol*. 2012; 590(Pt 8): 1871–80. DOI: 10.1113/jphysiol.2011.218271.

107. Gaengel, K., Genové, G., Armulik, A., Betsholtz, C. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009; 29(5):630-8. DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.161521.
108. García-Gimeno MF, Rodríguez-Camarero SJ, Tagarro-Villalba S, Ramalle-Gomara E, Ajona JA, González ME, et al. Reflux or not reflux? Reflexiones sobre la publicación anglosajona del término en las varices primarias de los miembros inferiores en relación con nuestro entorno). *Angiología*. 2010; 62(2):65-70.
109. Gay J. On varicose Disease of the Lower extremities. The Lettsomian Lectures of 1867. Churchill. London 1868.
110. Geier B, Mumme A, Hummel T, Marpe B, Stücker M, Ascitto GI. Validity of duplex-ultrasound in identifying the cause of groin recurrence after varicose vein surgery. *J Vasc Surg* 2009; 968–72. DOI: 10.1016/j.jvs.2008.10.058
111. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, et al. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk1/KDR activation. *J Biol Chem*. 1998; 273 (46): 30336- 43. DOI: 10.1074/jbc.273.46.30336.
112. Geudens I, Gerhardt H. Coordinating cell behaviour during blood vessel formation. *Development* 2011; 138(21): 4569–4583. DOI: 10.1242/dev.062323. Geier B, Olbrich S, Barbera L, Stucker M, Mumme A. Validity of the macroscopic identification of neovascularization at the saphenofemoral junction by the operating surgeon. *J Vasc Surg*. 2005; 41:64-8. DOI: 10.1016/j.jvs.2004.10.032.
113. Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, et al. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2 (+) AC133 (+) endothelial precursor cells. *Circ Res*. 2001; 88: 167–174. DOI: 10.1161/01.res.88.2.167.
114. Giménez Gaibar A. Indicaciones y resultados de la cirugía de varices. Técnica convencional *Angiología* 2006; 58 S2: 3-10.

115. Glass GM. Neovascularization in recurrence of the varicose great saphenous vein following transection. *Phlebology* 1987; 2 81- 91.
116. DOI: 10.1177/026835558700200205.
117. Goldman MP. Closure of the greater saphenous vein with endoluminal radiofrequency thermal heating of the vein wall in combination with ambulatory phlebectomy: preliminary 6-month follow-up. *Dermatol Surg*, 2000; 26(5): 452-6. DOI: 10.1046/j.1524-4725.2000.99300.x.
118. González J, Valls N, Brito R, Rodrigo R. Essential hypertension and oxidative stress: New insights. *World J Cardiol* 2014; 26; 6(6): 353-366. DOI: 10.4330/wjc.v6.i6.353
119. Goon PK, Lip GY, Boos CJ, Stonelake PS, Blann AD. Circulating endothelial cells, endothelial progenitor cells, and endothelial microparticles in cancer. *Neoplasia* 2006; 8:79–88. DOI: 10.1593/neo.05592.
120. Gougos A, Letarte M. Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. *Journal of Immunology*, 1988; 141(6), 1925–1933.
121. Gougos A, Letarte M. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem*.1990; 265: 8361-4.
122. Gougos A, St Jacques S, Greaves A, O’connell PJ, d’Apice AJ, Bühring HJ, et al. Identification of distinct epitopes of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of endothelial cells, leukemic cells, and syncytiotrophoblasts. *Int Immunol*.1992; 4(1): 83–92. DOI: 10.1093/intimm/4.1.83.
123. Guerrero-Esteo M, Lastres P, Letamendía A, Pérez-Álvarez MJ, Langa C, López LA, et al. Endoglin overexpression modulates cellular morphology, migration, and adhesion of mouse fibroblasts. *Eur J Cell Biol*. 1999; 78(9): 614–623. DOI: 10.1016/S0171-9335(99)80046-6.
124. Guess JJ, Isaacs MN. Comparison of surgery and ultrasound guided sclerotherapy for treatment of saphenous varicose veins. Must the criteria for assessment be the same? *Int Angiol*. 2000; 19:299-302.

125. Graulich W, Nettelbeck DM, Fischer D, Kissel T, Müller R. Cell type specificity of the human endoglin promoter. *Gene* 1999; 227(1): 55–62. DOI: 10.1016/S0378-1119(98)00585-X
126. Guías de Práctica Clínica en Enfermedad Venosa Crónica 2015 Capítulo Español de Flebología y Linfología
127. Harvey W. *Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et sanguini in Animalibus* Frankfurt W Fitzer 1628
128. Häggström M. "Galería médica de Mikael Häggström 2014". *WikiJournal of Medicine*. 1 (2). DOI: 10.15347 / wjm / 2014.008.
129. Hausner EA, Orsini JA, Foster LL, Modzelewski TC, Merrill JJ, Perkowski SZ, et al. Vascular endothelial growth factor in porcine coronary arteries following balloon angioplasty. *J Invest Surg* 1999; 12: 15–23. DOI: 10.1080/089419399272728.
130. Hawinkels, LJ., Kuiper P, Wiercinska, E, Verspaget H W, Liu Z, Pardali E. et al Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis. *Cancer Res*. 2010; 70(10): 4141–4150. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4466.
131. Hazarika S, O Dokun, A, Li Y, Popel AS, Kontos CD, Annex BH. Impaired angiogenesis after hindlimb ischemia in type 2 diabetes mellitus: Differential regulation of vascular endothelial growth factor receptor 1 and soluble vascular endothelial growth factor receptor 1. *Circ Res*. 2007; 101(9): 948–956. DOI:10.1161/CIRCRESAHA.107.160630.
132. Hill J, Treasure T. Reducing the risk of venous thromboembolism (deep vein thrombosis and pulmonary embolism) in inpatients having surgery: summary of NICE guidance. *BMJ*. 2007 May 19; 334(7602):1053-4. DOI: 10.1136/bmj.39174.678032.AD.
133. Hippócrates the Genuine Works of Hippócrates vol 2 Adams EF trans New York Wm Wood & Co. 1886.
134. Hollingsworth SJ, Powell GI, Barker SG, Cooper DG Primary varicose veins: altered transcription of VEGF and its receptors (KDR, flt-1, soluble flt-1) with sapheno-femoral

- junction incompetence *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2004 Mar; 27(3):259-68. DOI: 10.1016/j.ejvs.2003.12.015
135. Holme JB, Skajaa K, Holme K. Incidence of lesions of the saphenous nerve after partial or complete stripping of the long saphenous vein. *Acta Chir Scand* 1990; 156:145 – 8.
136. Homans J. The etiology and treatment of varicose ulcer of the leg. *Surg Gynecol Obstet.* 1917; 24:300–311.
137. Horbelt D, Denkis A, Knaus P. A portrait of Transforming Growth Factor  $\beta$  superfamily signalling: Background matters. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012; 44(3): 469–474. DOI: 10.1016/j.biocel.2011.12.013.
138. Horecka A , Hordyjewska A , Biernacka J , Dąbrowski W , Zubilewicz T , Malec A , et al. Intense remodeling of extracellular matrix within the varicose vein: the role of gelatinases and vascular endothelial growth factor. *Ir J Med Sci.* 2021 Feb; 190(1):255-259. DOI: 10.1007/s11845-020-02289-1
139. Howard A, Howard DP, Davies AH. Surgical Treatment of the incompetent saphenous vein. *Handbook of venous disorders. Guidelines of the American venous forum 3rd Ed.* Hodder Arnold. London 2009. 400-408..
140. Hubbard SR. Structural analysis of receptor tyrosine kinases *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 1999.71.343-358.
141. Hung SP, Yang MH, Tseng KF, Lee O K Hypoxia-induced secretion of TGF- $\beta$ 1 in mesenchymal stem cell promotes breast cancer cell progression. *Cell Transplantation* 2013; 22(10):1869–1882. DOI: 10.3727/096368912X657954.
142. Ide A, Baker N, Warren S. Vascularization of the Brown Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. *AJR.* 1939; 42: 891–899.
143. Inonue M, Itoh H, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Komatsu R, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible

- pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis. *Circulation* 1998; (20): 2108-2116. DOI: 10.1161/01.cir.98.20.2108.
144. Ishida A, Murray J, Saito Y, Kanthou C, Benzakour O, Shibuya M, et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptors in smooth muscle cells. *J Cell Physiol.*, 2001; 188 (3): 359-368. DOI: 10.1002/jcp.1121
145. Jaakola P, Mole DR, Tian Y-M, Willson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, et al. Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by  $\text{o}_2$ -regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001; 292:468–72. DOI: 10.1126/science.1059796.
146. Jacob MP, Badier-Commander C, Fontaine V, Benazzoug Y, Feldman L, Michel JB. Extracellular matrix remodeling in the vascular wall. *Pathol Biol. (Paris)* 2001; 49:326-32. DOI: 10.1016/s0369-8114(01)00151-1.
147. Jacobs BN, Andraska EA, Andrea BS, Obi T, Wakefield TW, Pathophysiology of varicose veins. *J Vasc Surg Venous and Lymphat Disord.* 2017; 5:460-7. DOI: 10.1016/j.jvsv.2016.12.014.
148. Jeanneret C, Baldi T, Hailemariam S, Koella C, Gewaltig J, Biedermann BC. Selective loss of extracellular matrix proteins is linked to biophysical properties of varicose veins assessed by ultrasonography. *Br J Surg.* 2007; 94(4):449–456. DOI: 10.1002/bjs.5630.
149. Jerkic M, Rivas-Elena JV, Prieto M, Carrón R, Sanz-Rodríguez F, Pérez-Barriocanal F, et al. Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *FASEB J.* 2004; 18(3): 609–611. DOI: 10.1096/fj.03-0197fje.
150. Jerkic M, Rivas-Elena JV, Santibañez JF, Prieto M, Rodríguez-Barbero A, Perez-Barriocanal F, et al. Endoglin regulates cyclooxygenase-2 expression and activity. *Circ Res* 2006; 99(3): 248–256. DOI: 10.1161/01.RES.0000236755.98627.69.
151. Jin Y, Muhl L, Burmakin M, Wang Y, Duchez AC, Betsholtz C, et al. Endoglin prevents vascular malformation by regulating flow-induced cell migration and specification through VEGFR2 signalling. *Nat Cell Biol.* 2017; 19(6): 639–652. DOI: 10.1038/ncb3534.

152. Jin Y, Muhl L, Burmakin M, Wang Y, Duchez AC, Betsholtz C, et al. Endoglin prevents vascular malformation by regulating flow-induced cell migration and specification through VEGFR2 signalling. *Nat Cell Biol.* 2017; 19(6): 639–652. DOI: 10.1038/ncb3534.
153. Jin Y, Xu G, Huang J, Zhou D, Huang X, Shen L. Analysis of the association between the insertion/deletion polymorphism within the 3' untranslated region of COL1A2 and chronic venous insufficiency. *Ann Vascular Surg.* 2013; 27 (7) 959-63. DOI: 10.1016/j.avsg.2013.04.001.
154. Johnson JL, Jackson CL, Angelini GD, George SJ. Activation of matrix-degrading metalloproteinases by mast cell proteases in atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18:1707-15. DOI: 10.1161/01.atv.18.11.1707.
155. Jones L, Braithwaite BD, Selwyn D, Cooke S, Earnshaw JJ. Neovascularisation is the principal cause of varicose vein recurrence: results of a randomised trial of stripping the long saphenous vein. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1996; 12:442–455. DOI: 10.1016/j.ejvs.2011.06.015.
156. Jovine L, Darie CC, Litscher ES, Wassarman PM. Zona pellucida domain proteins. *Annu Rev Biochem.* 2005; 74: 83-114. DOI: 10.1146/annurev.biochem.74.082803.133039.
157. Jovine L, Qi H, Williams Z, Litscher ES, Wassarman PM. The ZP domain is conserved module for polymerization of extracellular proteins. *Nature Cell Biol.* 2002; 4: 457-61. DOI: 10.1038/ncb802.
158. Kaelin WG, Jr., Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell.* 2008; 30:393–402. DOI: 10.1016/j.molcel.2008.04.009.
159. Kanwar A, Hansrani M, Lees T, Stansby G. Trends in varicose vein therapy in England: radical changes in the last decade. *Ann R Coll Surg Engl.* 2010; 92(4):341-6. DOI: 10.1308/003588410X12518836440649.
160. Kapur NK, Morine KJ, Letarte M. Endoglin: a critical mediator of cardiovascular health. *Vasc Health Risk Manag.* 2013; 9:195-206. DOI: 10.2147/VHRM.S29144.



161. Kianifard B, Holdstock JM, Whiteley MS. Radiofrequency ablation (VNUS closure) does not cause neo-vascularisation at the groin at one year: results of a case controlled study. *Surgeon* 2006; 4:71-74. DOI: 10.1016/s1479-666x (06)80032-6.
162. Kleinman ME, Greives MR, Churgin SS, Blechman KM, Chang EI, Ceradini DJ, et al. Hypoxia-induced mediators of stem/progenitor cell trafficking are increased in children with hemangioma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27(12):2664-2670. DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.150284.
163. Koch S, Tugues S, Li X, Gualandi L, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Bioch J.* 2011; 437(2): 168-183. DOI: 10.1042/BJ20110301.
164. Kofler NM, Cuervo H, Uh MK, Murtomäki A, Kitajewski J. Combined deficiency of Notch1 and Notch3 causes pericyte dysfunction, models CADASIL, and results in arteriovenous malformations. *Sci Rep.* 2015; 13; 5: 16449. DOI: 10.1038/srep16449.
165. Koizumi T, Shiraishi T, Hagihara N, Tabuchi K, Hayashi T, Kawano T. Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors in and around intracranial arteriovenous malformations. *Neurosurgery.* 2002; 50:117-124. DOI: 10.1097/00006123-200201000-00020.
166. Kokubo M, Nozaka T, Takahashi Y. New method of flush saphenofemoral ligation that is expected to inhibit varicose vein recurrence in the groin: Flush ligation using the avulsion technique method. *Ann Vasc Dis.* 2018; 11(3):286-91. DOI: 10.3400/avd.oa.18-00086.
167. Koleva RI., Conley BA, Romero D, Riley K S, Marto JA, Lux C, et al. Endoglin structure and function: Determinants of endoglin phosphorylation by transforming growth factor- $\beta$  receptors. *J Biological Chemi.* 2006; 281(35): 25110–25123. DOI: 10.1074/jbc.M601288200.
168. Korn C, HG Mechanisms of Vessel Pruning and Regression. *Dev Cell.* 2015; 6, 34 (1):5-17. DOI: 10.1016/j.devcel.2015.06.004.

169. Kostas T, Ioannou CV, Touloupakis E, Daskalaki E, Giannoukas AD, Tsetis D, et al. Recurrent varicose veins after surgery: a new appraisal of a common and complex problem in vascular surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2004; 27(3):275-82. DOI: 10.1016/j.ejvs.2003.12.006.
170. Kowalewski R, Małkowski A, Sobolewski, K. Vascular endothelial growth factor and its receptors in the varicose vein wall. *Acta Angiologica* 2011; 17(2):141-149.
171. Labropoulos N, Bhatti A, Leon L, Borge M, Rodriguez H, Kalman P. Neovascularization after great saphenous vein ablation. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2006; 31:219- 22. DOI: 10.1016/j.ejvs.2005.06.030.
172. Labropoulos N, Giannoukas AD, Delis K, Mansour MA, Kang SS, Nicolaidis AN, et al. Where does venous reflux start? *J Vasc Surg*. 1997; 26:736-42. DOI: 10.1016/s0741-5214(97)70084-3.
173. Labropoulos N, Tiongson J, Pryor L, Tassiopoulos AK, Kang SS, Mansour MA, et al. Definition of venous reflux in lower-extremity veins. *J Vasc Surg*, 2003; 38(4): 793–798. DOI: 10.1016/s0741-5214(03)00424-5.
174. Lahtenvuo JE, Lahtenvuo MT, Kivela A, Rosenlew C, Falkevall A, Klar J, et al. Vascular endothelial growth factor-B induces myocardium-specific angiogenesis and arteriogenesis via vascular endothelial growth factor receptor-1- and neuropilin receptor-1-dependent mechanisms. *Circulation*. 2009; 119(6):845-856. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.816454.
175. Lastres P, Martín-Perez J, Langa C, Bernabeu C. Phosphorylation of the human-transforming-growth-factor-beta-binding protein endoglin. *Biochem J*. 1994; 301(3): 765–768. DOI: 10.1042/bj3010765.
176. Leños A, Navarro CS, Sillas LJ, Ramírez K L, Isordia I, Jiménez LM. Soluble Endoglin as a Marker for Preeclampsia, Its Severity, and the Occurrence of Adverse Outcomes. *Hypertension* 2019;74(4),991–997. DOI/10.1161/HYPERTENSIONAHA. 119.13348.

177. Lenard A, Ellertsdottir E, Herwig L, Krudewig A, Sauteur L, Belting HG, et al. In vivo analysis reveals a highly stereotypic morphogenetic pathway of vascular anastomosis. *Dev Cell*, 2013.25(5), 492–506. DOI: 10.1016/j.devcel.2013.05.010.
178. Leung D, Cachianes G, Kuang W, Goeddel D, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246(4935):1306–1309. DOI: 1126/science.2479986.
179. Li C, Issa R, Kumar P, Hampson I, López-Novoa, JM, Bernabeu, C, et al. CD105 prevents apoptosis in hypoxic endothelial cells. *J Cell Sci*. 2003; 116(13): 2677–2685. DOI:10.1242/jcs.00470.
180. Li DY, Sorensen LK, Brooke BS, Urness LD, Davis C, Taylor DG. Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* 1999; 284: 1534-1537. DOI: 10.1126/science.284.5419.1534.
181. Ligi D, Croce L, Mosti G, Raffetto JD, Mannello F. Chronic Venous Insufficiency: Transforming Growth Factor- $\beta$  Isoforms and Soluble Endoglin Concentration in Different States of Wound Healing. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(10): 2206. DOI: 10.3390/ijms18102206.
182. Lim CS, Gohel MS, Shepherd AC, Paleolog E, Davies AH. Venous hypoxia: a poorly studied etiological factor of varicose veins. *J Vasc Res*. 2011; 48:185-94 DOI: 10.1159/000320624.
183. Lim CS, Kiriakidis S, Sandison A, Paleolog EM, Davies AH. Hypoxia-inducible factor pathway and diseases of the vascular wall. *J Vasc Surg*. 2013; 58(1):219-30. DOI: 10.1016/j.jvs.2013.02.240
184. Linton RR. The communicating veins of the lower leg and the operative technique for their ligation. *Ann Surg*.1938; 107: 582-593. DOI: 10.1097/00000658-193804000-00013.
185. Llorca O, Trujillo A, Blanco FJ, Bernabeu C. Structural model of human endoglin, a transmembrane receptor responsible for hereditary hemorrhagic telangiectasia *J Mol Biol* 2007. Jan 19; 365(3):694-705. DOI: 10.1016/j.jmb.2006.10.015.

186. Loesch A, Dashwood MR. On the sympathetic innervation of the human greater saphenous vein: relevance to clinical practice. *Curr Vasc Pharmacol*. 2009; (7):58-67. DOI: 10.2174/157016109787354150.
187. Logsdon EA, Finley SD, Popel, AS, MacGabhann, FA. Systems biology view of blood vessel growth and remodelling. *J Cell Mol Med* .2014 Aug; 18(8):1491-508. DOI: 10.1111/jcmm.12164.
188. López-Novoa JM, Bernabeu C. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Hear Circ Physiol*. 2010; 299:H959-74. DOI: 10.1152/ajpheart.01251.2009.
189. López-Novoa JM, Bernabeu C. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Hear Circ Physiol*. 2010; 299:H959-74. DOI: 10.1152/ajpheart.01251.2009.
190. Lozano FS, Marinello J, Moreno RM, Aguilar MD, López-Quintana A, González-Porras JR, et al. Monitoring the practice of vascular surgery: findings from a national registry (1996-2011). *World J Surg*. 2014; 38(1):241-51. DOI: 10.1007/s00268-013-2272-6.
191. Lu D, Kasab GS. Review. Shear and stretch in mechanobiology. *J R Soc. Interface*. 2011; 8: 1379–185. DOI: 10.1098/rsif.2011.0177.
192. Lurie F, Creton D, Eskof B, Kabnick LS, Kistner RL, Pichot O, et al. Prospective randomized study of endovenous radiofrequency obliteration (Closure) versus ligation and vein stripping two years follow up. *Eur J Vasc and Endovasc Surg*. 2005;29:67-73. DOI: 10.1016/j.ejvs.2004.09.019.
193. Lutun A, Tjwa M, Moons L, Wu Y, Angelillo-Scherrer A, Fang Liao F, et al. Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor Angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med*. 2002; 8(8):831–840. DOI: 10.1038/nm731.
194. Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L et al (2001) Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med*. 2001; 7:1194–1201. DOI: 10.1038/nm1101-1194.

195. Mahmoud M, Allinson KR, Zhai Z, Oakenfull R, Ghandi P, Adams RH, et al. Pathogenesis of arteriovenous malformations in the absence of endoglin. *Circ Res.*2010; 106(8): 1425–1433. DOI:10.1161/CIRCRESAHA.109.211037.
196. Mahmoud M, Borthwick G, Hislop A, Arthur HM. Endoglin and activin receptor-like-kinase 1 are co-expressed in the distal vessels of the lung: implications for two familial vascular dysplasias, HHT and PAH. *Lab Invest.* 2009; 89(1):15–25. DOI: 10.1038/labinvest.2008.112.
197. Mahmoud M, Upton, PD, Arthur HM. Angiogenesis regulation by TGFbeta signalling: clues from an inherited vascular disease. *Biochem Soc Trans.* 2011; 39(6): 1659–1666. DOI: 10.1042/bst20110664.
198. Majno G. *The Healing hand. Man and wound in ancient world* Harvar University Press. 1978
199. Malhotra R, Paskin-Flerlage S, Zamanian RT, Zimmerman P, Schmidt JW, Deng DY. Circulating angiogenic modulatory factors predict survival and functional class in pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ.* 2013; 3(2): 369–80. DOI: 10.4103/2045-8932.110445.
200. Mancini ML, Terzic A, Conley BA, Oxburgh LH, Nicola T, Vary C P H. Endoglin plays distinct roles in vascular smooth muscle cell recruitment and regulation of arteriovenous identity during angiogenesis. *Dev Dyn.* 2009; 238(10): 2479–2493. DOI: 10.1002/dvdy.22066
201. Mannello F, Ligi D, Canale M, Raffetto JD. Omic profiles in chronic venous ulcer wound fluid: innovative applicatios for translational medicine. *Expert Rev Mol Diag,* 1-26 2014. DOI 10.1586/14737159.2014.927312.
202. Marchuk DA. Genetic abnormalities in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Curr Opin Hematol.* 1998; 5: 332-338. DOI: 10.1097/00062752-199809000-00005.
203. Martin-Ramirez J, Hofman M, van den Biggelaar M, Hebbel RP, Voorberg J. Establishment of outgrowth endothelial cells from peripheral blood. *Nat Protoc.* 2012; 7:1709–1715. DOI: 10.1038/nprot.2012.093.

204. Martin JS, Dickson MC, Cousins FM, Kulkarni AB, Karlsson S, Akhurst RJ. Analysis of homozygous TGF beta 1 null mouse embryos demonstrates defects in yolk sac vasculogenesis and hematopoiesis. *Ann N Y Acad Sci.* 1995; 752:300–308. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1995.tb17439.x.
205. Martinez-Zapata MJ, Vernooij RWM, Simancas-Racines D, Uriona Tuma SM, Stein AT, Moreno Carriles RMM, et al. Phlebotonics for venous insufficiency. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2020, Issue 11. Art. No.: CD003229. DOI: 10.1002/14651858.CD003229.pub4.
206. Masoud GN, Li W. HIF-1 $\alpha$  pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy *Acta Pharm Sin B.* 2015; 5(5):378-389: DOI: 10.1016/j.apsb.2015.05.007.
207. Massagué, J. TGFbeta in Cancer. *Cell.* 2008; 134(2): 215–30. DOI: 10.1016/j.cell.2008.07.001.
208. Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe P J. Inducible operation of the erythropoietin 3' enhancer in multiple cell lines: evidence for a widespread oxygen-sensing mechanism. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1993; 15, 90(6):2423-7. DOI: 10.1073/pnas.90.6.2423.
209. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang G-W, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999; 399:271–5. DOI: 10.1038/20459.
210. Mayo CH. Treatment of the varicose veins. *Surg Gynecol Obstet.* 1906; 2:385-388
211. McDonald J, Wooderchak-Donahue W, VanSant C, Whitehead K, Stevenson DA, Bayrak-Toydemir P. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: Genetics and molecular diagnostics in a new era. *Front Genet.* 2015; 26; 6(1). DOI: 10.3389/fgene.2015.00001.
212. Mellor RH, Brice G, Stanton AW, French J, Smith A, Jeffery S, et al. Mutations in FOXC2 are strongly associated in primary valve vein failure in veins of the lower limb. *Circulation* 2007; 115 (14):1912-20. DOI 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.675348.

213. Meurer SK, Tihaa L, Lahme B, Gressner AM, Weiskirchen R. Identification of endoglin in rat hepatic stellate cells: new insights into transforming growth factor beta receptor signaling. *J Biol Chem.* 2007; 280(4): 3078–87. DOI: 10.1074/jbc.M405411200.
214. Mikuła-Pietrasik J, Uruski P, Aniakiewicz K, Sosińska P, Krasinski Z, Tykarski A, et al. Serum from Varicose Patients Induces Senescence-Related Dysfunction of Vascular Endothelium Generating Local and Systemic Proinflammatory Conditions. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016:2069290. DOI: 10.1155/2016/2069290.
215. Milone M, Salvatore G, Maietta P, Sosa Fernandez LM, Milone F. Recurrent varicose veins of the lower limbs after surgery. Role of surgical technique (stripping vs. CHIVA) and surgeon's experience. *G Chir.* 2011; 32(11-12):460-3.
216. Modi SJ, Kulkarni VM. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR-2)/KDR Inhibitors: Medicinal Chemistry Perspective. *Medicine in Drug Discovery* 2019; 2:100009. 1-111. DOI: 10.1016/j.medidd.2019.100009.
217. Modlich U, Kaup FJ, Augustin HG Cyclic angiogenesis and blood vessel regression in the ovary: blood vessel regression during luteolysis involves endothelial cell detachment and vessel occlusion. *Lab Invest.* 1996; 74(4): 771–780.
218. Moñux G, de la Serna-Soto M, Plá-Sánchez F, Zamorano-León J, Segura A, Rial Rodrigo, et al. Compression stockings attenuate the expression of proteins associated with vascular damage in human varicose veins *Journal of Vascular Surgery: Venous and Lymphatic Disorders.* 2021; 9, 2:428-434. DOI: 10.1016/j.jvsv.2020.05.020
219. Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF- $\beta$  and the TGF- $\beta$  Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016; 2;8(5):a021873. DOI: 10.1101/cshperspect.a021873.
220. Mühlberger D, Zumholz AK, Brenner E, Mumme A, Stücker M, Falkenstein T, et al. Cellular senescence at the saphenofemoral junction in patients with healthy, primary varicose and recurrent varicose veins. *Vascular* 2021. May DOI: 10.1177/17085381211012882.

221. Muller G, Behrens J, Nussbaumer U, Böhlen P, Birchmeier W. Inhibitory action of transforming growth factor beta on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 5600–4. DOI: 10.1073/pnas.84.16.5600.
222. Müller-Bühl U, Leutgeb R, Engeser P, Achankeng EN, Szecsenyi J, Laux G. Varicose veins are a risk factor for deep venous thrombosis in general practice patients. *Vasa* 2012; 41(5):360-365. DOI: 10.1024/0301-1526/a000222.
223. Munasinghe A, Smith C, Kianifard B, Price BA, Holdstock JM, Whiteley MS. Strip-track revascularization after stripping of the great saphenous vein. *Br J Surg.* 2007; 94:840-3. DOI: 10.1002/bjs.5598.
224. Muñoz R, Arias Y, Ferreras JM, Jiménez P, Rojo MA, Bernabeu C, et al. Transient injury-dependent up-regulation of CD105 and its specific targeting with an anti-vascular anti-mouse endoglin-nigrin b immunotoxin. *Med Chem.* 2012; 8(6):996–1002. DOI: 10.2174/1573406411208060996,
225. Muñoz-Chápuli R. Evolution of angiogenesis. *Int J Dev Biol.* 2011; 55(4–5): 345–351. DOI: 10.1387/ijdb.103212rm.
226. Murad MH, Coto-Yglesias F, Zumaeta-García M, Elamín MB, Duggirala MK, Erwin PJ. A systematic review and metaanalysis of the treatment of varicose veins, *J Vasc Surg.* 2011; 53 495-65S. DOI: 10.1016/j.jvs.2011.02.031.
227. Myers TT, Smith LR. Results of Stripping Operation in Treatment of Varicose Veins, *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.* 1954; 29:583-590.
228. Naim MM, Elshawary MA. Histological assesment of the long safenous vein in normal and varicous veins. *Egyptian J Histol.* 2005; 28: 281-90.
229. Nesbitt C, Eifell RK, Coyne P, Badri H, Bhattacharya V, Stansby G. Endovenous ablation (radiofrequency and laser) and foam sclerotherapy versus conventional surgery for great saphenous vein varices. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011; Oct 5;(10):CD005624. DOI: 10.1002/14651858.CD005624.pub2.



230. Nicolaides AN, Hussein MK, Szendro G, Christopoulos D, Vasdekis S, Clarke H. The relation of venous ulceration with ambulatory venous pressure measurements. *J Vasc Surg.* 1993 Feb; 17(2):414-9. DOI: 10.1067/mva.1993.37694.
231. Nicolaides A, Kakkos S, Baekgaard N, Comerota A, Maeseneer M, Eklof B, et al. Management of chronic venous disorders of the lower limbs – guidelines according to scientific evidence. *Int Angiol.* 2014; 33(2):87-208.
232. Nicolaides A, Kakkos S, Baekgaard N, Comerota A, de Maeseneer M, Eklof B, et al. Management of chronic venous disorders of the lower limbs. Guidelines According to Scientific Evidence. Part I. *Int Angiol.* 2018 Jun; 37(3):181-254. DOI: 10.23736/S0392-9590.18.03999-8.
233. Nicolaides A, Kakkos S, Baekgaard N, Comerota A, de Maeseneer M, Eklof B, et al. Management of chronic venous disorders of the lower limbs. Guidelines According to Scientific Evidence. Part II. *Int Angiol.* 2020 Jun; 39(3):175-240. DOI:10.23736/S0392-9590.20.04388-6.
234. North BJ, Sinclair DA. The Intersection between Aging and Cardiovascular Disease *Circ Res.* 2012; 110: 1097-1108. DOI:10.1161/CIRCRESAHA.111.246876.
235. Núñez-Gómez E, Pericacho M, Ollauri-Ibáñez C, Bernabeu C, López-Novoa JM. The role of endoglin in post-ischemic revascularization. *Angiogenesis* 2017; Feb 20(1):1-24. DOI: /10.1007/s10456-016-9535-4.
236. Nyameke I, Shephard NA, Davies B, Heather BP, Earnshaw JJ. Clinicopathological evidence that neovascularisation is a cause of recurrent varicose veins. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1998; 15: 412–415. DOI: 10.1016/s1078-5884(98)80202-5.
237. O’Connell P, McKenzie A, Fiscicaro N, Rockman S, Pearse M, D’Apice AJ. Endoglin: a 180-kD endothelial cell and macrophage restricted differentiation molecule. *Clin Exp Immunol* 1992; 90(1): 154–159. DOI: 10.1111/j.1365-2249.1992.tb05848.x.

238. O'Donnell TF, Balk EM, Dermody M, Tangney E, Iafrati MD. Recurrence of varicose veins after endovenous ablation of the great saphenous vein in randomized trials. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord.* 2016; 4(1):97-105. DOI: 10.1016/j.jvsv.2014.11.004.
239. Ogura S., Kurata K., Hattori Y, Takase H, Ishiguro-Oonuma, T, Hwang Y. Sustained inflammation after pericyte depletion induces irreversible blood-retina barrier breakdown. *JCI Insight.* 2017; Feb 9; 2(3): e90905. DOI: 10.1172/jci.insight.90905.
240. Oh SP, Seki T, Goss KA, Imamura T, Yi Y, Donahoe PK, et al. Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2000; 97:2626–2631. DOI: 10.1073/pnas.97.6.2626.
241. Ojdana D, Safiejko K, Lipska A, Sacha P, Wieczoc P, Radziwon P, et al. The inflammatory reaction during chronic venous disease of the lower limbs *Folia Histochem Cytobiol.* 2009; 47(2): 185-9. DOI: 10.2478/v10042-009-0029-8.
242. Ollauri-Ibáñez C. Efecto de la sobreexpresión de endoglina sobre la angiogénesis tumoral y fisiológica. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca., 2018.
243. Ollauri-Ibáñez C, López-Novoa JM, Pericacho M. Endoglin-based biological therapy in the treatment of angiogenesis-dependent pathologies. *Expert Opin Biol Ther.* 2017; 17:1053-1063. DOI: 10.1080/14712598.2017.1346607.
244. Oloffson B, Pajusola K, Kaipainen A, von Eule G, Joukov V, Saksela O, et al. VEGF B a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1996; 93: 2576-2581. DOI: 10.1073/pnas.93.6.2576.
245. Olson N, van der Vliet A. Interactions between nitric oxide and hypoxia-inducible factor signaling pathways in inflammatory disease. *Nitric Oxide* 2011; 25:125–137. DOI: 10.1016/j.niox.2010.12.010.
246. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, & Claesson-Welsh, L. VEGF receptor signalling in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006; 7(5): 359–371. DOI: 10.1038/nrm1911.

247. Ono T, Bergan JJ, Schmid-Schönbein GW, Takase S. Monocyte infiltration into venous valves. *J Vasc Surg*. 1998; 27: 158-66. DOI: 10.1016/s0741-5214(98)70303-9.
248. Ortega MA, Romero B, Asúnsolo Á, Sainz F, Martínez-Vivero C, Álvarez-Mon M, et al. Behavior of Smooth Muscle Cells under Hypoxic Conditions: Possible implications on the varicose veins endothelium. *Biomed Res Int*. 2018; 2018:7156150. DOI: 10.1155/2018/7156150.
249. Overall CM, Wrana JL, Sodek J. Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kD gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor- $\beta$ 1 in human fibroblasts: comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression. *J Biol Chem*. 1991; 266:14064-71.
250. Paauwe M, ten Dijke P, Hawinkels L J. Endoglin for tumor imaging and targeted cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2013; 17(4):421–435. DOI:10.1517/14728222.2013.758716.
251. Pan CC, Kumar S, Shah N, Hoyt DG, Hawinkels, LJ. Myhre K, et al. Src-mediated post-translational regulation of endoglin stability and function is critical for angiogenesis. *J Biol Chem*. 2014; 289(37):25486–2549. DOI: 10.1074/jbc.M114.578609.
252. Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, Sessa WC. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest*. 1997; 100:3131–3139. DOI: 10.1172/JCI119868.
253. Park S, DiMaio TA, Liu W, Wang S, Sorenson CM, Sheibani N. Endoglin regulates the activation and quiescence of endothelium by participating in canonical and non-canonical TGF-signaling pathways. *J Cell Sci*. 2013; 126(6): 1392–1405. DOI:10.1242/jcs.117275.
254. Park KH, Park WJ. Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches *J Korean Med Sci* 2015; 30: 1213-1225. DOI.org/10.3346/jkms.2015.30.9.1213.

255. Parker WL, Goldring MB, Philip A. Endoglin is expressed on human chondrocytes and forms a heteromeric complex with betaglycan in a ligand and type II TGF $\beta$  receptor independent manner. *J Bone Miner Res.* 2003; 18(2): 289–302. DOI: 10.1359/jbmr.2003.18.2.289.
256. Pascual G, Mendieta C, García-Honduvilla N, Corrales C, Bellón JM, Buján J. TGF-beta1 upregulation in the aging varicose vein. *J Vasc Res.* 2007; 44(3):192-201. DOI: 10.1159/000100375.
257. Patel-Hett S, D'Amore PA. Signal transduction in vasculogenesis and developmental angiogenesis. *Int J Dev Biol.* 2011; 55(4-5):353-63. DOI: 10.1387/ijdb.103213sp.
258. Patel-Hett S, D'Amore PA. Signal transduction in vasculogenesis and developmental angiogenesis. *International Journal of Developmental Biology* 2011; 55(4–5): 353–369. DOI: 10.1387/ijdb.103213sp.
259. Pelosi E, Castelli G, Martin-Padura I, Bordoni V, Santoro S, Conigliaro A et al. Human haemato-endothelial precursors: cord blood CD34+ cells produce haemogenic endothelium. *PLoS One* 2012; 7:e51109. DOI: 10.1371/journal.pone.0051109
260. Pérez-Gómez E, Eleno N, López-Novoa JM, Ramírez JR, Velasco B, Letarte M, et al. Characterization of murine S-endoglin isoform and its effects on tumor development. *Oncogene* 2005; 24:4450–4461. DOI: 10.1038/sj.onc.1208644.
261. Perkins JM. Standard varicose vein surgery. *Phlebology* 2009; 24 Suppl. I: 34-41. DOI: 10.1258/phleb.2009.09s004
262. Perrin M, Allaert FA. Intra- and inter-observer reproducibility of the Recurrent Varicose Veins after Surgery (REVAS) classification. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2006; 32:326-32. DOI: 10.1016/j.ejvs.2006.02.018
263. Perrin MR, Guex JJ, Ruckley CV, DePalma RG, Royle JP, Elkof B, et al. The REVAS Group. Recurrent varices after surgery (REVAS), a consensus document. *Cardiovasc Surg.* 2000; 8:233–245.

264. Perrin MR, Labropoulos N, Leon LR. Presentation of the patient with recurrent varices after surgery (REVAS). *J Vasc Surg*. 2006; 43: 327-34. DOI: 10.1016/j.jvs.2005.10.053.
265. Pocock E, Alsaigh T, Mazor R, Schmid-Schönbein G. Cellular and molecular basis of venous insufficiency. *Vasc Cell*. 2014; 6(1): 24. DOI: 10.1186/s13221-014-0024-5.
266. Pohl U, Holtz J, Busse R, Bassenge E. Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension*. 1986; 8(1):37–44. DOI: 10.1161/01.hyp.8.1.37.
267. Pollack AA, Wood EH. Venous pressure in the saphenous vein in ankle in men during exercise and changes in posture. *J Appl Physiol*, 1949; 1:649-53.
268. Portolés J, Quiroga B, López Gómez JM. Nuevos tratamientos estimuladores de eritropoyesis para corregir la anemia de la enfermedad renal. *Nefrología Sup Ext*. 2016; 7(1):6-14.
269. Potente, M., Gerhardt, H., Carmeliet, P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*. 2011 146: 873–887. DOI: 10.1016/j.cell.2011.08.039.
270. Prabhu SD, Frangogiannis NG. The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction: From inflammation to fibrosis. *Circ Res*. 2016; 119(1):91-112. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303577.
271. Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med*. 2003; 9:677-84. DOI: 10.1038/nm0603-677.7
272. Qian L, Huang Y, Spencer CI, Foley A, Vedantham V, Liu L, et al. In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature* 2012; 485(7400):593-598. DOI: 10.1038/nature11044.
273. Qu R, Silver MM, Letarte M. Distribution of endoglin in early human development reveals high levels on endocardial cushion tissue mesenchyme during valve formation. *Cell Tissue Res*. 1998; 292: 333-343. DOI: 10.1007/s004410051064.

274. Queensland Health. Guideline for the prevention of Venous Thromboembolism (VTE) in adult hospitalised patients. Published by the State of Queensland. December 2018.
275. Radaev S, Zou Z, Huang T, Lafer EM, Hinck AP, Sun PD. Protein Structure and Folding: Ternary complex of Transforming Growth Factor-  $\beta$ 1 Reveals Isoform-specific ligand recognition and receptor recruitment in the Superfamily. *J. Biol. Chem.* 2010, 285:14806-14814. DOI: 10.1074/jbc.M109.079921
276. Rass K, Frings N, Glowacki P, Gräber S, Tilgen W, Vogt T, et al. Same Site Recurrence is More Frequent after Endovenous Laser Ablation Compared with High Ligation and Stripping of the Great Saphenous Vein: 5year Results of a Randomized Clinical Trial (RELACS Study). *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2015; 50(5):648-56. DOI: 10.1016/j.ejvs.2015.07.020.
277. Rathouska J, Jezkova K, Nemeckova I, Nachtigal P. Soluble endoglin, hypercholesterolemia and endothelial dysfunction. *Atherosclerosis.*2015; 243(2):383–388. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis. 2015.10.003.
278. Reich-Schupke S, Mumme A, Altmeyer P, Stuecker M. Decorin expression with stump recurrence and neovascularization after varicose vein surgery--a pilot study. *Dermatol Surg.* 2011(4); 37: 480-5. DOI: 10.1111/j.1524-4725.2011.01912.x.
279. Rewerk S, Noppeney T, Winkler M, Willeke F, Duczek A, Meyer AJ, et al. Pathogenesis of primary varices und recurrent varicose veins at the sapheno-femoral junction. The role of VEGF and VEGF-receptor. *Phlebologie* 2007; 36(03): 137-142. DOI: 10.1055/s-0037-1622176.
280. Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker P, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest.* 2002; 109:337–346. DOI: 10.1172/JCI14327.
281. Rigbi KA, Palfreyman SJ, Beverley C, Michaels JA. Surgery versus esclerotherapy for the treatment of varicose veins. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004; 18(4): CD004980. DOI: 10.1002/14651858.CD004980.

282. Rivera LB, Brekken RA. SPARC promotes pericyte recruitment via inhibition of endoglin-dependent TGF- $\beta$ 1 activity. *J Cell Biol.* 2011; 193(7): 1305–19. DOI: 10.1083/jcb.201011143.
283. Roberts DM, Kearney JB, Johnson JH, Rosenberg MP, Rakesh Kumar R, Bautch VL. The vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flt-1 (VEGFR-1) modulates Flk-1 (VEGFR-2) signaling during blood vessel formation. *Am J Pathol.* 2004; 164(5):1531-5. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63711-X.
284. Rokhlin O, Cohen M, Kubagawa H, Letarte M, Cooper M. Differential expression of endoglin on fetal and adult hematopoietic cells in human bone marrow. *J Immunol.* 1995; 154(9): 4456–65.
285. Rossi E, Pericacho M, Bachelot-Loza C, Pidar D, Gaussem P, Poirault-Chassac S, et al. Human endoglin as a potential new partner involved in platelet–endothelium interactions. *Cell Mol Life Sci.* 2018; 75(7):1269-1284. DOI: 10.1007/s00018-017-2694-7.
286. Rossi E, Sanz-Rodriguez F, Eleno N, Düwell A, Blanco FJ, Langa C, et al. Endothelial endoglin is involved in inflammation: Role in leukocyte adhesion and transmigration. *Blood* 2013; 121(2): 403–415. DOI: 10.1182/blood-2012-06-435347.
287. Rossi E, Smadja DM, Boscolo E, Langa C, Arevalo MA, Pericacho M, et al. Endoglin regulates mural cell adhesion in the circulatory system. *Cell Mol Life Sci.* 2016; 73(8): 1715–1739. DOI: 10.1007/s00018-015-2099-4.
288. Rossman MJ, Kaplon RE, Hill SD, McNamara MN, Santos-Parker JR, Pierce GL, et al. Endothelial cell senescence with aging in healthy humans: prevention by habitual exercise and relation to vascular endothelial function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2017; 313(5): H890–H895. DOI: 10.1152/ajpheart.00416.2017.
289. Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol.* 1986; 250 (6 Pt 2):H1145–9. DOI:10.1152/ajpheart.1986.250.6.H1145.

290. Ruiz-Llorente L, Gallardo-Vara E, Rossi E, Smadja DM, Botella LM, Bernabeu C. Endoglin and alk1 as therapeutic targets for hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Expert Opin Ther. Targets* 2017. 21(10):933-947. DOI: 10.1080/14728222.2017.1365839.
291. Sadick H, Hage J, Goessler U, Bran G, Riedel F, Bugert P, et al. Does the genotype of HHT patients with mutations of the ENG and ACVRL1 gene correlate to different expression levels of the angiogenic factor VEGF? *Int J Mol Med.*2008; 22:575–80.
292. Saharinen P, Eklund L., Miettinen J., Wirkkala R., Anisimov A., Winderlich M, et al. Angiopoietins assemble distinct Tie2 signalling complexes in endothelial cell-cell and cell-matrix contacts. *Nat Cell Biol.* 2008; May; 10(5):527-37. DOI: 10.1038/ncb1715.
293. Saito T, Bokhove M, Croci R, Zamora-Caballero S, Han L, Letarte M, et al. Structural basis of the human endoglin-BMP9 interaction: Insights into BMP signaling and HHT1. *Cell Rep.*2017; 19(9): 1917–1928. DOI; 10.1016/j.celrep.2017.05.011.
294. Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. *J Biol Chem.* 1997; 5; 272(36):22642-7. DOI: 10.1074/jbc.272.36.22642.
295. Sánchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Corbí A, Attisano L, Bernaneu C. Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor- $\beta$  pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. *J Biol Chem.* 2001; 276(42): 38527–38535. DOI:10.1074/jbc.M104536200.
296. Sanchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Langa C. Bernabeu C. Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor- $\beta$  pathways. *J Biol Chem.*2002; 277:43799–43808. DOI: 10.1074/jbc. M207160200.
297. Sansilvestri-Morel P, Fioretti F, Rupin A, Senni K, Fabiani JN, Godeau G, et al. Comparison of extracellular matrix in skin and saphenous veins from patients with varicose veins: does the skin reflect venous matrix changes? *Clin Sci (Lond).* 2007; 112(4):229–239. DOI: 10.1042/CS20060170.



298. Sansilvestri-Morel P, Rupin A, Badier-Commander C, Kern P, Fabiani JN, Verbeuren TJ, et al. Imbalance in the synthesis of collagen type I and collagen type III in smooth muscle cells derived from human varicose veins. *J Vasc Res.* 2001; 38:560-8. DOI: 10.1159/000051092
299. Sansilvestri-Morell P, Fioretti F, Rupin A, Senni K, Fabiani JN, Godeau G, et al. Comparison of extracellular matrix in skin and saphenous veins from patients with varicose veins: Does the skin reflect venous matrix changes? *Clin Sci (Lond).* 2007; 112: 229-39. DOI: 10.1042/CS20060170.
300. Santibañez JF, Letamendia A, Perez-Barriocanal F, Silvestri C, Saura M, Vary C, et al. Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF- $\beta$  signaling. *J Cell Physiol.* 2007; 210(2): 456–468. DOI: 10.1002/jcp.20878.
301. Sanz-Rodríguez F, Guerrero-Esteo M, Botella LM, Banville D, Vary CPH, Bernabéu, C. Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the LIM family of proteins. *J Biol Chem.* 2004; 279(31): 32858–32868. DOI:10.1074/jbc.M400843200.
302. Scazziotto A, Pons S. Heparin effects beyond antithrombotic activity. *Hematología.* 21 N° Extraordinario • XXIII Congreso Argentino de Hematología: 166-175, 2017.
303. Semenza GL, Neufeldt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1991; 88: 5680-4. DOI: 10.1073/pnas.88.13.5680.
304. Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 1994; 269:23757–63.
305. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 2012; 33(4):207-14. DOI: 10.1016/j.tips.2012.01.005.
306. Sen CK, Khanna S, Venojarvi M, Trikha P, Ellison EC, Hunt TK, et al. Copper-induced vascular endothelial growth factor expression and wound healing. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282: H1821-7. DOI: 10.1152/ajpheart.01015.2001.

307. Senger DR, Perruzzi CA, Feder J, Dvorak HF. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res.* 1986; 46(11): 5629–5632. DOI: 10.1016/0006-291x (89)92678-8.
308. Serra R, Buffone G, de Francisco A, Mastrangelo D, Molinari V, Montemurro R, et al. A genetic study of chronic venous insufficiency. *Ann Vasc Surg.* 2012; 26 (5) 636-642. DOI: 10.1016/j.avsg.2011.11.036.
309. Sharma D, Shastri S, Sharma P. Intrauterine growth restriction: Antenatal and postnatal aspects. *Clin Med Insights Pediatr.* 2016; 10:67-83. DOI: 10.4137/CMPed.S40070.
310. Shepherd AC, Gohel MS, Brown LC, Metcalfe MJ, Hamish M, Davies AH. Randomized clinical trial of VNUS ClosureFAST radiofrequency ablation versus laser for varicose veins. *Br J Surg.* 2010; 97(6):810-8. DOI: 10.1002/bjs.7091.
311. Shibuya M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes Cancer.* 2011; 2 (12):1097- 105. DOI: 10.1177/1947601911423031.
312. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis* 2006; 9:225–230. DOI 10.1007/s10456-006-9055-8.
313. Shoeibi, S, Mozdziak, P, Mohammadi S. Important signals regulating coronary artery angiogenesis. *Microvasc Res.* 2018; 117:1-9. DOI: 10.1016/j.mvr.2017.12.002.
314. Shovlin CL, Letarte M. Hereditary haemorrhagic telangiectasia and pulmonary arteriovenous malformations: issues in clinical management and review of pathogenic mechanisms. *Thorax* 1999; 54: 714-729. DOI: 10.1136/thx.54.8.714.
315. Siekmann AF, Affolter M, Belting HG. The tip cell concept 10 years after: New players tune in for a common theme. *Exp Cell Res.* 2013; 15,319(9):1255-63. DOI: 10.1016/j.yexcr.2013.01.019.

316. Suzuki H, Hirashima C, Nagayama S, Takahashi K, Yamamoto T, Matsubara S, et al. Increased serum levels of sFlt-1/PlGF ratio in preeclamptic women with onset at  $\geq$ 32 weeks. *Pregnancy Hypertens*. 2018; 12:96-103. DOI: 10.1016/j.preghy.2018.03.008.
317. Suzuki H, Hirashima C, Nagayama S, Takahashi K, Yamamoto T, Matsubara S, et al. Increased serum levels of sFlt-1/PlGF ratio in preeclamptic women with onset at  $<$  32 weeks compared with  $>$ 32 weeks. *Pregnancy Hypertens* 2018; 12:96-103. DOI: 10.1016/j.preghy.2018.03.008.
318. Tahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/ VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 2005; 109: 227–241. DOI: 10.1042/CS20040370.
319. Takase S, Bergan JJ, Schmid-Schönbein GW. Expression of adhesion molecules and cytokines on saphenous veins in chronic venous insufficiency. *Ann Vasc Surg*. 2000; 14:427-35. DOI: 10.1007/s100169910092.
320. Takase S, Lerond L, Bergan JJ, Schmid-Schonbein GW. The inflammatory reaction during venous hypertension in the rat. *Microcirculation* 2000; 7:41-52.
321. Tessari L, Cavezzi A, Frullini A. Preliminary experience with new sclerosing foam in the treatment of varicose veins. *Dermatologic Surgery*, 2001; 27(1):58–60.
322. Thakker GD, Hajjar DP, Muller WA, Rosengart TK. The role of phosphatidylinositol3-kinase in vascular endothelial growth factor signaling. *J Biol Chem*. 1999; 274 (15): 10002- 7. DOI: 10.1074/jbc.274.15.10002.
323. Theivacumar NS, Darwood R, Gough MJ. Neovascularisation and recurrence 2 years after varicose vein treatment for sapheno-femoral and great saphenous vein reflux: a comparison of surgery and endovenous laser ablation. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2009; 38:203-7. DOI: 10.1016/j.ejvs.2009.03.031.
324. Tighe P, Negm O, Todd I, Fairclough L. Utility, reliability and reproducibility of immunoassay multiplex kits. *Methods* 2013; 61(1): 23–29. DOI; 10.1016/j.ymeth.2013.01.003.

325. Tisato V, Zauli G, Voltan R, Gianesini S, di Iasio MG, Volpi I, et al. Endothelial cells obtained from patients affected by chronic venous disease exhibit a pro-inflammatory phenotype. *PLoS one*, 2012; 7(6): e39543. DOI: 10.1371/journal.pone.0039543.
326. Tonar Z, Kural T, Jr Kočová P, Nedorost L, Witter K. Vasa vasorum quantification in human varicos and great and small safenous veins. *Ann Anat.* 2012; 194:473-481. DOI: 10.1016/j.aanat.2012.02.019.
327. Torsney E, Charlton R, Parums D, Collis M, Arthur HM. Inducible expression of human endoglin during inflammation and wound healing in vivo *Inflamm Res.* 2002 Sep;51(9):464-70. DOI: 10.1007/pl00012413
328. Tournay R *La sclerose des varices.* 2<sup>a</sup> ed. Expansion Scientifique Francaise. Paris. 1975
329. Travers JP, Brookes CE, Evans J, Baker DM, Kent C, Makin GS, et al. Assessment of wall structure and composition of varicose veins with reference to collagen, elastin, and smooth muscle content. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1996; 11(2):230–237. DOI: 10.1016/s1078-5884(96)80058-x.
330. Trendelenburg F. *Über die Unterbindung der Vena Saphena Magna bei Unterschenkel Varicen Bein* *Z Clin Chir.* 1891; 7:195-210.
331. Tripathi R , Ralhan R , Saxena S , S Salhan S, Rath G. Soluble VEGFR-1 in pathophysiology of pregnancies complicated by hypertensive disorders: the Indian scenario 2013; *Journal of Human Hypertension* 27, 107 -- 114 DOI: 10.1038/jhh.2012.2;
332. Valbuena-Diez AC, Blanco FJ, Oujó B, Langa C, Gonzalez-Núñez M, Llano E, et al. Oxysterol-induced soluble endoglin release and its involvement in hypertension. *Circulation* 2012; 126(22): 2612–2624. DOI: 10.1161/CIRCULATION.AHA.112.101261.
333. Van Korlaar I, Vossen C, Rosendaal F, Cameron L, Bovill E, Kaptein A. Quality of life in venous disease. *Thromb Haemost.* 2003; 90:27-35.

334. Van Laake LW, Van Den Driesche S, Post S, Feijen A, Jansen MA, Driessens MH, et al. Endoglin has a crucial role in blood cell-mediated vascular repair. *Circulation* 2006; 114(21): 2288–97. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.639161.
335. Van Rij AM, Jiang P, Solomon C, Christie RA, Hill GB. Recurrence after varicose vein surgery: a prospective long-term clinical study with duplex ultrasound scanning and air plethysmography. *J Vasc Surg.* 2003; 38:935-43. DOI: 10.1016/s0741-5214(03)00601-3.
336. Van Rij AM, Jones GT, Hill BG, Amer M, Thomson IA, Pettigrew RA, et al. Mechanical inhibition of angiogenesis at the saphenofemoral junction in the surgical treatment of varicose veins: early results of a blinded randomized controlled trial. *Circulation* 2008; 118:66-74 DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.726869.
337. Van Rij AM, Jones GT, Hill GB, Jiang P. Neovascularization and recurrent varicose veins: more histologic and ultrasound evidence *J V Surg.* 2004;(40):296 -302. DOI: 10.1016/j.jvs.2004.04.031.
338. Velasco S, Álvarez-Munoz P, Pericacho M, Dijke PT, Bernabeu C, López -Novoa JM, et al. L- and S-endoglin differentially modulate TGFbeta1 signaling mediated by ALK1 and ALK5 in L6E9 myoblasts. *J Cell Sci.* 2008; 121:913–919. DOI: 10.1242/jcs.023283.
339. Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med.* 2006; 12:642–649. DOI: 10.1038/nm1429.
340. Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta and fibrosis. *World J Gastroenterol.* 2007; 13(22): 3056–3062. DOI:10.3748/wjg.v13.i22.3056.
341. Virchow R. *Die Cellular Pathologie.* Verlag von August Hirschwald .Berlin 1859.
342. Wali MA, Eid RA. Changes of elastic and collagen fibers in varicose veins. *Int Angiol.* 2002; 21:337-43.

343. Walsh J. Galen's writings and influences inspiring them *Ann Med Hist Part I*: 14 1934.
344. Weis S, Cui J, Barnes L, Ceresh D. Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. *J Cell Biol.* 2004; 167(1): 223-229. DOI: 10.1083/jcb.200408130.
345. White AM, Price BA, Davies CE, Nemchand JL, Whiteley MS. Quantification of groin neovascular tissue with three-dimensional ultrasound before and after endovenous laser ablation using the hedgehog technique. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord.* 2021; 9(3):785-6. DOI: 10.1016/j.jvsv.2020.10.015.].
346. Wick A, Wick W, Waltenberger J, Weller M, Dichgans J, Schulz JB. Neuroprotection by hypoxic preconditioning requires sequential activation of vascular endothelial growth factor receptor and Akt. *J Neurosci.* 2002; 22(15):6401-6407. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-15-06401.2002.
347. Winterborn RJ, Foy C, Earnshaw JJ. Causes of varicose vein recurrence: late results of a randomized controlled trial of stripping the long saphenous vein. *J Vasc Surg.* 2004; 40:634-9. DOI: 10.1016/j.jvs.2004.07.003.
348. Witmer AN, van Blijswijk BC, Dai J, Hofman P, Partanen TA, Vrensen GF, et al. VEGFR-3 in adult angiogenesis. *J Pathol.* 2001; 195: 490-7. 55. DOI: 10.1002/path.969.
349. Wong SH, Hamel L, Chevalier S, Philip A. Endoglin expression on human microvascular endothelial cells Association with betaglycan and formation of higher order complexes with TGF- $\beta$  signalling receptors *Eur. J. Biochem.* 2000; 267: 550-5560. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01621.x.
350. Wunderlich ML, Dodge M E, Dhawan R, Shek WR. Multiplexed Fluorometric ImmunoAssay Testing Methodology and Troubleshooting. *J. Vis. Exp.* 2011(58), e3715. DOI:10.3791/3715.
351. Yamakawa H, Muraoka N, Miyamoto K, Sadahiro T, Isomi M, Haginiwa S, et al. Fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factor promote cardiac reprogramming under

- defined conditions. *Stem Cell Reports*. 2015; 5 (6):1128-1142. DOI: 10.1016/j.stemcr.2015.10.019.
352. Yamaki T, Nozaki M, Sasaki K. Alternative Greater Saphenous Vein–Sparing Surgery. *Dermatologic Surgery* 2002; 28(2): 162–167. DOI:10.1046/j.1524-4725.2002.01119.x.
353. Zengin E, Chalajour F, Gehling UM, Ito WD, Treede H, Lauke H, et al. Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development* 2006; 133:1543–1551. DOI: 10.1242/dev.02315.
354. Zhang H, Shaw A, Mak A, Letarte M. Endoglin is a component of the transforming growth factor (TGF)-beta receptor complex of human pre-B leukemic cells. *J Immunol*. 1996; 156(2): 564–573.
355. Zhao T, Zhao W, Meng W, Meng W, Liu C, Chen Y, Bhattacharya et al. Vascular endothelial growth factor-D mediates fibrogenic response in myofibroblasts. *Mol Cell Biochem*. 2016; 413(1-2):127-135. DOI: 10.1007/s11010-015-2646-1.
356. Zhu Y, Sun Y, Xie L, Kunlin J, Sheibani N, Greenberg DA. Hypoxic induction of endoglin via mitogen-activated protein kinases in mouse brain microvascular endothelial cells. *Stroke* 2003; 34:2483–88. DOI: 10.1161/01.STR.0000088644.60368.ED.





ANEXOS



## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ADNc:	ADN complementario
ALK1:	Activin receptor-like kinase 1
ALK5:	Activin receptor-like kinase 5
ANG1:	Angiopoyetina 1
ARN:	Ácido ribonucleico
ARNm:	ARN mensajero
BMP:	Proteína morfogenética de hueso (Bone Morphogenetic Protein)
BOEC:	Células endoteliales de la sangre (Blood Outgrowth Endothelial Cells)
CD:	Grupo de diferenciación (Cluster of Differentiation)
CEAP:	Clasificación CEAP
CHIVA:	Cura Hemodinámica Insuficiencia Venosa Ambulatoria
DPX:	Ecodoppler
ELISA:	Ensayo de inmunoabsorción ligaa enzimas (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)
Eng:	Endoglina
eNOS:	Óxido nítrico sintasa endotelial (endothelial Nitric Oxide Syntase)
EPC:	Células progenitoras endoteliales (Endothelial Progenitor Cells)
EPO:	Eritropoyetina
EDEV:	Enfermedad tromboembólica venosa
EVC:	Enfermedad venosa crónica
EVLA:	Endovascular Laser
FGF:	Factor de crecimiento de fibroblastos (Fibroblast Growth Factor)
FLK-1	Fetal liver Kinase 1 o VEGFR
FLT-1	FMS gen like tirosin Kinase 1
FOX	Proteínas FOX ( <i>Forkhead box</i> )
GAPDH:	Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa
HBPM:	Heparina de bajo peso molecular
HHT:	Telangiectasia hemorrágica hereditaria (Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia)

HIF-1:	Factor inducible por hipoxia 1 (Hypoxia-Inducible Factor 1)
HRE:	Elemento de respuesta a hipoxia (Hypoxia Responsive Element)
HUVEC:	Células endoteliales de venas umbilicales humanas (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)
ICAM:	Molécula de adhesión intercelular (InterCellular Adhesion Molecule)
IVC:	Insuficiencia venosa crónica
KDR:	Kinase insert domain
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos (Mitogen-Activated Protein Kinases)
MAV:	Malformaciones arteriovenosas
MCP-1:	Proteína quimiotáctica de los monocitos-1 (Monocyte chemoattractant protein -1)
MEC:	Matriz extracelular
MFIA:	Multiplex
MMPs:	Metaloproteinasas de matriz (Matrix Metalloproteinase)
NADPH:	Nicotiamida adenina Dinucleotido fosfato
NCBI:	National Center for Biotechnology Information
NO:	Óxido nítrico (Nitric Oxide)
NOS:	Óxido nítrico sintasa
ODD:	Dominio de degradación oxígeno dependiente (Oxygen-dependent Degradation Domain)
OMS:	Organización Mundial de la Salud
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PDGF:	Factor de crecimiento derivado de plaquetas (Platelet-Derived Growth Factor)
PLGF:	Factor de crecimiento placentario (Placental Growth Factor)
PVV:	Varices primarias ( Primary Varicose Veins)
qPCR:	PCR en tiempo real
REVAS:	Recurrent varices after surgery
RFA:	Radiofrecuencia
RGD:	Secuencia RGD
ROS:	Especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species)
RVV	Varices recidivadas (Recurrent varicose veins)
RTK:	Receptores tirosin kinasa
sEng:	Endoglina soluble
SD	Desviación típica SD (standard deviation)
SEM	Error standard de la media (standard error of the mean),

TEP:	Tromboembolismo pulmonar
TVP:	Trombosis venosa profunda
TGF- $\beta$ :	Factor de crecimiento transformante $\beta$ (Transforming Growth Factor $\beta$ )
T $\beta$ R-II:	Receptor tipo II del TGF- $\beta$ (TGF- $\beta$ Receptor II)
TIMP:	Tissue inhibitors of MMP
VCAM	Molécula de adhesión vascular (Vascular Cell Adhesion Molecule)
VE-cadherina:	Cadherina del endotelio vascular (Vascular Endothelial Cadherin)
VEGF:	Factor de crecimiento endotelial vascular (Vascular Endothelial Growth Factor)
VEGFR-1:	Receptor tipo 1 de VEGF (VEGF Receptor type 1)
VEGFR-2:	Receptor tipo 2 de VEGF (VEGF Receptor type 2)
VHL:	von Hippel-Lindau
VPF:	Factor de permeabilidad vascular (Vascular Permeability Factor)
VSCM:	Celulas musculares lisas vasculares.
VSI:	Vena safena interna
vWF:	Factor von Willebrand (von Willebrand Factor)
ZP:	Zona pelúcida



## FIGURAS Y TABLAS

**Figura 1.** Clasificación CEAP de la EVC. Guía de práctica clínica en enfermedad venosa crónica del Capítulo de Flebología y Linfología de la Sociedad Española de Angiología y Cirugía Vascular. Angiología 2015.

**Figura 2.** Papiro de Ebers y Tabla de la Acrópolis ateniense (Siglo IV a.C.).

**Figura 3.** Anatomía venosa de Leonardo y Sistema venoso de Andreas Vesalio.

**Figura 4.** “Varicose disease” de John Gay. Fotografía de Friedrich Trendelemburg.

**Figura 5.** Charles Horace Mayo y W.W Babcock.

**Figura 6.** Secuencia de una safenectomía interna infragenicular. CAUSA.

**Figura 7.** Elaboración de espuma con Polidocanol. CAUSA.

**Figura 8.** Fuente de radiofrecuencia RFA y catéter centimetrado.

**Figura 9.** Imágenes de RFA con catéter (CAUSA).

**Figura 10.** Modificado de Caggiati A., Bergan J., Gloviczki P., Jantet G., Wendell- Smith C., Partsch H. Nomenclatura venosa consensuada. J Vasc Surg 2002.

**Figura 11.** Corte de vena safena interna varicosa. Hematoxilina eosina x2 y x4 aumentos. D<sup>a</sup> M. Sancho. (CAUSA).

**Figura 12.** Factores etiopatogénicos e inflamación como protagonista de la IVC.

**Figura 13.** Los cambios hemodinámicos producen la activación endotelial induciendo la expresión de factores de crecimiento y de moléculas de adhesión y señalización facilitando el reclutamiento y activación de leucocitos y monocitos que mediante proteinasas y ROS determinan la disfunción endotelial. Modificado Mannello *et al.*, 2014.

**Figura 14.** Teorías etiopatogénicas de la IVC. Modificado de Bergan *et al.*, 2006.

**Figura 15.** Fuerzas radiales y circunferenciales sobre la pared venosa.

**Figura 16.** Cascada Hipóxica en la fisiopatología de las varices esenciales.

**Figura 17.** Cascada inflamatoria en la fisiopatología de las varices esenciales.

**Figura 18.** Remodelamiento en la Fisiopatología de las varices esenciales.

**Figura 19.** Tipos de varices recidivadas.

**Figura 20.** Clasificación de Fischer de recidiva inguinal.

**Figura 21.** Fotografía intraoperatoria de un neocayado inguinal con detalle del ovillo neoangiogénico (CAUSA).

**Figura 22.** Esquema diferencial de Angiogénesis y Vasculogénesis.

**Figura 23.** Inducción de VEGF-A a células de fenotipo migratorio (tip cells).

**Figura 24.** Vía Notch. En las células tip la señalización es débil y en las células stalk en cambio muy activa.

**Figura 25.** Progresión en la formación del neovaso: Sprouting.

**Figura 26.** Algunos de los protagonistas de la IVC y la angiogénesis.

**Figura 27.** HIF y Homeostasia del O<sub>2</sub>.

**Figura 28.** Estructura 2D HIF y estructura 3D de HIF1A (Protein Data Bank in Europe).

**Figura 29.** Ciclado de HIF-1.

**Figura 30.** HIF como factor de transcripción.

**Figura 31.** Estructura 3D e Interacción de VEGF (en rojo /azul) con el receptor RTK (verde). Modificado de Hubbard (1999).

**Figura 32.** Receptores VEGF. Häggström 2014.

**Figura 33.** Estructuras 3D del TGF $\beta$  y T $\beta$ Ry de la Endogлина. (Radaev et al., 2010 y Llorca el al., 2007)

**Figura 34.** Isoformas de endogлина con diferente dominio citoplasmático. La endogлина soluble es la forma circulante de endogлина, producida por proteólisis de ambas. Ollauri-Ibáñez C. Efecto de la sobreexpresión de endogлина sobre la angiogénesis tumoral y fisiológica. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca., 2018.

**Figura 35.** Unión safenofemoral y entorno cicatricial.

**Figura 36.** Fisiopatología de la cicatrización.

**Figura 37.** Factores moleculares en la recurrencia varicosa inguinal. ROS: Especies Reactivas de Oxígeno; HIF-1 y 2, Factor 1 y 2 inducible por hipoxia; TGF- $\beta$ , factor de crecimiento transformante beta; ALK 5 y 1 (receptores TGB-  $\beta$ ) VEGF, Factor de Crecimiento Endotelial Vascular y sus receptores VEGFAR- 1 y 2).

**Figura 38.** Muestras de tejido. El grupo 1 control, biopsias de venas colaterales del cayado safeno. El grupo 2, muestras de varices primarias: 2A biopsias del cayado safeno-femoral; 2B, R3 de safena interna distales. El grupo 3, recidivas: las 3A biopsias del neocayado; las 3B biopsias de varices tronculares de ese territorio.

**Figura 39.** Método de purificación para la obtención de RNA en columna.

**Figura 40.** QPCR y ciclos de amplificación.

**Figura 41.** Primers comerciales utilizados.

**Figura 42.** Curva de amplificación de la qPCR.

**Figura 43.** Microesferas codificadas por color unidas covalentemente a los analitos. Las reacciones se cuantifican por la fluorescencia de la ficoeritrina (Charles River Laboratories International Inc Multiplexed fluorometric ImmunoAssay MFIA).

**Figura 44.** Fases del ensayo de inmunodetección multiplexada fluorométrico MFIA.



- Figura 45.** Expresión proximal del factor inducible por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ )
- Figura 46** Expresión proximal de Endoglina tisular
- Figura 47.** Expresión proximal de VEGF-A.
- Figura 48.** Expresión proximal de los receptores del VEGF-A, tipo 1 y 2 (VEGFR-1 y VEGFR-2)
- Figura 49.** Expresión distal del factor inducible por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ )
- Figura 50.** Expresión distal de Endoglina
- Figura 51.** Expresión distal de factor de crecimiento vascular endotelial A (VEGF-A)
- Figura 52.** Expresiones distales de VEGFR-1 y VEGFR-2
- Figura 53.** Expresión proximal y distal del factor inducible por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ).
- Figura 54.** Expresión proximal y distal de Endoglina tisular.
- Figura 55.** Expresión proximal y distal de VEGF-A.
- Figura 56.** Expresión proximal y distal de los receptores VEGFR-1 Y VEGFR-2
- Figura 57.** Determinaciones qPCR seriadas de Endoglina, VEGF, VEGFR-1 y VEGFR-2
- Figura 58.** Resumen resultados q PCR.
- Figura 59.** Expresión sEng en suero día 0
- Figura 60.** Expresión de VEGF en suero día 0
- Figura 61.** Expresión de VEGFR-1 Y VEGFR-2 en suero día 0
- Figura 62.** Expresión de Endoglina soluble en suero. Control a los 3 meses
- Figura 63.** Expresión de VEGF en suero. Control a los 3 meses.
- Figura 64.** Expresión de VEGFR-1 y VEGFR-2 en suero. Control a los 3 meses.
- Figura 65.** Expresión de Endoglina soluble en suero. Día 0 y control 3 meses.
- Figura 66.** Expresión de VEGF en suero. Día 0 y control 3 meses.
- Figura 67.** Expresión de VEGFR-1 y VEGFR-2 en suero. Día 0 y control 3 meses.
- Figura 68.** Determinaciones séricas seriadas de Endoglina, VEGF, VEGFR-1 y VEGFR-2.

**Figura 69.** Resumen resultados de determinaciones séricas. MFIA

**Figura 70.** CEAP y expresión tisular proximal de HIF, Endoglina y VEGF-A

**Figura 71.** CEAP y expresión tisular proximal de VEGFR-1 Y VEGFR-2

**Figura 72.** CEAP y expresión tisular distal de HIF, Endoglina y VEGF-A.

**Figura 73.** CEAP y expresión tisular proximal de VEGFR-1 Y VEGFR-2.

**Figura 74.** CEAP y expresión tisular proximal de HIF, Endoglina y VEGF-A en varices primarias.

**Figura 75.** CEAP y expresión tisular proximal de VEGFR-1 y VEGFR-2 en varices primarias.

**Figura 76.** CEAP y expresión tisular distal de HIF, Endoglina y VEGF-A en varices primarias.

**Figura 77.** CEAP y expresión tisular distal de VEGFR-1 y VEGFR-2 en varices primarias.

**Figura 78.** CEAP y expresión tisular proximal de HIF, Endoglina y VEGF-A en varices recidivadas.

**Figura 79.** CEAP y expresión tisular proximal de VEGFR-1 y VEGFR-2 en varices recidivadas.

**Figura 80.** CEAP y expresión tisular distal de HIF, Endoglina y VEGF-A en varices recidivadas.

**Figura 81.** CEAP y expresión tisular distal de VEGFR-1 y VEGFR-2 en varices recidivadas.

**Figura 82.** CEAP y expresión sérica de Endoglina y VEGF-A.

**Figura 83.** CEAP y expresión sérica de VEGFR-1 y VEGFR-2

**Figura 84.** CEAP y expresión sérica de Endoglina y VEGF-A en varices primarias.

**Figura 85.** CEAP y expresión sérica de VEGFR-1 y VEGFR-2 en varices primarias.

**Figura 86.** CEAP y expresión sérica de Endoglina y VEGF-A en varices recidivadas.

**Figura 87.** CEAP y expresión sérica de VEGFR-1 y VEGFR-2 en varices recidivadas.

**Tabla 1.** Familia de TGF Modificado de (Morikawa et al, 2016).

**Tabla 2.** Niveles de Endoglina y eventos vasculares (Nuñez Gómez et al., 2017).

**Tabla 3.** Distribución por sexo y edades de los tres grupos.

**Tabla 4.** Epidemiología grupo 1.

**Tabla 5.** Epidemiología grupo 2

**Tabla 6.** Epidemiología grupo 3

**Tabla 7.** Distribución por sexos y edades.

**Tabla 8.** Gráficas de distribución por sexo y edades

**Tabla 8.** Características de los Grupos 2 (VV) y 3 (RVV).

**Tabla 9.** Biomarcadores y resultados estadísticos de las determinaciones proximales.

**Tabla 10.** Biomarcadores y resultados estadísticos de las determinaciones distales

**Tabla 11.** Biomarcadores y resultados estadísticos de las determinaciones de suero día 0

**Tabla 12.** Biomarcadores y resultados estadísticos de las determinaciones de suero a 3 m.

**Tabla 13.** CEAP Grupo 2 (VV) y Grupo 3 (RVV).



## PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES

## 1. ARTÍCULOS PUBLICADOS

Carnicero JA, Méndez L, Pericacho M, García MB, Lozano FS. Impacto de la endogлина y de otros marcadores de angiogénesis en las varices recurrentes. Resultados preliminares. *Angiología* vol.74 no.1 Madrid ene./feb. 2022 Epub 14-Mar-2022.

DOI:10.20960/angiologia.00353

Lozano FS, Carnicero JA, Méndez L, García MB, Pericacho M. Endoglin and Other Angiogenesis Markers in Recurrent Varicose Veins. *J. Pers. Med.* 2022, 12(4), 528;

DOI:10.3390/jpm12040528

## 2 COMUNICACIONES A CONGRESO

:

Oliver Bonnelly Gonzalez, Jose Carnicero Martinez, Paula Velasco Hernandez, Carola Rubio Taboada, Jose Torres Hernandez, Francisco Lozano Sanchez HUSA, Salamanca. Marcadores De Angiogénesis En Las Varices Recurrentes., Comunicación libre en el 67 Congreso SEACV 31 mayo 3 de junio Burgos 2022.