

Artículo Original

# Estudio de la expresión de EGFL7 (Epidermal growth factor-like domain-containing protein 7) en la pared venosa de pacientes con enfermedad venosa crónica

Miguel A. Ortega <sup>1,2\*</sup>, Oscar Fraile-Martinez <sup>1,2</sup>, Cielo Garcia-Montero <sup>1,2</sup>, Ana M. Gomez-Lahoz<sup>1</sup>, Miguel A Alvarez-Mon <sup>1,2</sup>, Luis G. Guijarro <sup>2,3</sup>, Miguel A Saez<sup>1,2,4</sup>, Silvestra Barrena-Blázquez<sup>5</sup>, Fernando Ruiz-Grande<sup>6</sup>, Jorge Monserrat <sup>1,2</sup>, Natalio García-Honduvilla<sup>1,2</sup>, Melchor Alvarez-Mon <sup>1,2,7</sup>, Julia Bujan<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Universidad de Alcalá, Departamento de Medicina y Especialidades Médicas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, 28801 Alcalá de Henares, España. miguelangel.ortega@edu.uah.es; <https://orcid.org/0000-0003-2588-1708>. oscarfra.7@hotmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-4494-6397>. cielo.gmontero@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-6016-7855>. alahoz1199@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-3981-5138>. maalvarezdemon@icloud.com; <https://orcid.org/0000-0002-1987-0394>. jorge.monserrat@uah.es; <https://orcid.org/0000-0003-1775-4645>. natalio.garcia@uah.es; <https://orcid.org/0000-0003-0904-6198>. mjulia.bujan@uah.es; <https://orcid.org/0000-0003-2419-2476>.

<sup>2</sup> Instituto Ramón y Cajal de Investigaciones Sanitarias (IRYCIS), 28034 Madrid, España. luis.gonzalez@uah.es; <https://orcid.org/0000-0003-4979-2136>.

<sup>3</sup> Universidad de Alcalá, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas (CIBEREHD), 28801 Alcalá de Henares, España

<sup>4</sup> Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Central de la Defensa-UAH, 28001 Madrid, España. msaega1@oc.mde.es; <https://orcid.org/0000-0002-8389-258X>.

<sup>5</sup> Servicio de Cirugía General, Hospital Príncipe de Asturias, 28801 Alcalá de Henares, España. silvebarrena@gmail.com.

<sup>6</sup> Servicio de Cirugía Vascular, Hospital de la Princesa, 28834 Madrid, España. fruizgrande@hotmail.com.

<sup>7</sup> Servicio de Medicina Interna y Enfermedades del Sistema Inmune-Reumatología, Oncología (CIBEREHD), Hospital Universitario Príncipe de Asturias, 28806 Alcalá de Henares, España. mademons@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-1309-7510>.

\* Autor correspondencia: miguelangel.ortega@edu.uah.es; <https://orcid.org/0000-0003-2588-1708>

DOI: <https://doi.org/10.37536/RIECS.2022.7.1.307>

**Resumen:** La enfermedad venosa crónica (EVC) se trata de una amplia variedad de anomalías del sistema venoso de gran prevalencia en nuestra sociedad. Frecuentemente, se manifiesta en las extremidades inferiores en forma de vena varicosa (VV), cursando como una situación de hipertensión venosa ambulatoria que se agrava conforme progresa la enfermedad. Cada vez más estudios evidencian la importancia de los cambios moleculares y de la matriz extracelular en la fisiopatología de la EVC. EGFL-7 (Epidermal growth factor-like domain-containing protein 7) es un componente de gran importancia en el desarrollo y patología del sistema vascular, aunque su papel en la EVC todavía no ha sido esclarecido. Así, el objetivo del presente trabajo es analizar la expresión génica y proteica de EGFL7 en la pared venosa de pacientes con EVC (n=35) y sanos (n=27), mediante la realización de RT-qPCR e inmunohistoquímica, respectivamente. Nuestros resultados muestran como existe una disminución en la expresión de EGFL-7 en pacientes con EVC en comparación con las venas de individuos sanos. En su conjunto, nuestro trabajo apoya el papel de EGFL7 en la pérdida de la homeostasis vascular asociada a la EVC. Futuros estudios son necesarios para profundizar en las implicaciones de estos cambios en el tejido venoso patológico, así como el desarrollo de posibles estrategias dirigidas a esta diana.

**Palabras Clave:** Enfermedad venosa crónica, Epidermal growth factor-like domain-containing protein 7, Vena varicosa.

**Abstract:** Chronic venous disease (CVD) is a wide variety of anomalies of the venous system that are highly prevalent in our society. Frequently, it manifests in the lower extremities in the form of varicose veins (VV), presenting as a situation of ambulatory venous hypertension that worsens as the disease progresses. More and more studies show the importance of molecular changes and of the extracellular matrix in the pathophysiology of CVD. EGFL-7 (Epidermal growth factor-like domain-containing protein 7) is a component of great importance in the development and pathology of the vascular system, although its role in CVD has not yet been clarified. Thus, the objective of this study is to analyze the gene and protein expression of EGFL7 in the venous wall of patients with CVD (n=35) and healthy patients (n=27), by performing RT-qPCR and immunohistochemistry, respectively. Our results show how there is a decrease in the expression of EGFL-7 in patients with CVD compared to the veins of healthy individuals. As a whole, our work supports the role of EGFL7 in the loss of vascular homeostasis associated with CVD. Future studies are necessary to delve into the implications of these changes in the pathological venous tissue, as well as the development of possible strategies aimed at this target.

**Key words:** Chronic venous disease, Epidermal growth factor-like domain-containing protein 7, Varicose vein.

---

## 1. Introducción

La enfermedad venosa crónica (EVC) refiere un conjunto de trastornos del sistema venoso que de manera frecuente se manifiesta en las extremidades inferiores en forma de venas varicosas (VVs) [1,2]. La EVC se trata de un trastorno altamente representado en sociedades occidentales. Se estima que tiene una prevalencia aproximadamente de un 60-70% y que entorno a un 25% lo manifiesta en forma de VVs [3], con una incidencia anual aproximada de un 2.6% en mujeres y 1.9% en varones [4]. Entre los factores de riesgo para padecer EVC destacan el historial familiar, el sedentarismo, el hábito tabáquico, la edad, el sexo femenino, el embarazo o la obesidad [5-7].

Fisiopatológicamente, la EVC se caracteriza por una situación de hipertensión venosa ambulatoria, que aumenta conforme progresa la enfermedad [8]. Esta hipertensión va a tener efectos muy importantes en la pared venosa, que responde por mecanismos de dilatación que se asocian con una incompetencia o fracaso valvular, lo que a su vez aumenta la inflamación [9,10]. Estos cambios se relacionan con una marcada respuesta inflamatoria, cambios en el comportamiento y función del endotelio, de las células musculares lisas, alteraciones hemodinámicas y microcirculatorias así como una marcada hipoxia del tejido [11]. De igual manera, se ha demostrado la importancia de la remodelación de la matriz extracelular (MEC) en el desarrollo y progresión de la EVC. De hecho, trabajos anteriores han señalado como existe un cambio de la MEC en las VVs que se asocia con su progresión y fisiopatología [12,13], apoyando así la importancia de seguir profundizando en los cambios acaecidos en la MEC de la pared venosa de estos pacientes.

EGFL-7 (Epidermal growth factor-like domain-containing protein 7) es un potente factor angiogénico, estrechamente ligado con el desarrollo vascular y endotelial [14]. Asimismo, este componente es un modulador negativo muy importante del proceso de elastogénesis vascular [15]. Además, se ha observado como pacientes embarazadas con EVC muestran una disminución de este componente en el tejido placentario, relacionándose con una alteración en la homeostasis del componente elástico en este órgano [16]. Así, el ánimo del presente trabajo es analizar la expresión génica y proteica de este componente en la pared venosa de pacientes con EVC y compararla con su expresión en venas no patológicas mediante el uso de RT-qPCR e inmunohistoquímica, respectivamente.

## 2. Material y Métodos

### 2.1. Diseño del estudio

Se trata de un estudio transversal de 35 pacientes con diagnóstico clínico de EVC en comparación con 27 pacientes control sin enfermedad venosa (CS). Los criterios de inclusión fueron los siguientes: mujeres y hombres con diagnóstico de EVC, con índice de masa corporal (IMC) menor o igual a 25; con y sin reflujo venoso en la vena safena mayor; consentimiento informado firmado; y compromiso de seguimiento en el pre y postoperatorio, así como de entrega de muestras de tejido. Los criterios de exclusión fueron pacientes con malformaciones venosas o insuficiencia arterial, pacientes sin acceso a su historia clínica, pacientes con patologías que pudieran afectar el sistema cardiovascular (enfermedades infecciosas, diabetes, hipertensión y dislipidemia), pacientes con hábitos tóxicos y aquellos con incertidumbre de participando en el seguimiento. El diagnóstico clínico de EVC y la evaluación del reflujo venoso se basaron en una ecografía Doppler color no invasiva (7,5 a 10 MHz) de los sistemas de venas superficiales y profundas. Los segmentos de la vena safena para el grupo HV se verificaron durante la extracción de órganos para la cirugía de derivación.

Este estudio se realizó de acuerdo con principios éticos básicos (autonomía, inocuidad, beneficio y justicia distributiva); su desarrollo sigue los estándares de Buena Práctica Clínica y los principios enunciados en la última Declaración de Helsinki (2013) y el Convenio de Oviedo (1997). El proyecto fue aprobado por el comité de ética del Hospital Militar Gómez-Ulla (37/17).

### 2.2. Procesamiento de muestras

Para la colección de muestras se extrajo la totalidad de la vena safena mayor mediante safenectomía. Estos fragmentos se introdujeron en dos tubos estériles, uno con solución de ARN later (Ambion, Austin, TX, EE. UU.) y otro con medio MEM (Minimum Essential Medium) con 1% de antibiótico/antimicótico (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU). Las muestras se procesaron en una campana de flujo laminar Telstar AV 30/70 Müller clase II 220 V 50 MHz (Grupo Telstar SA, Terrassa, España) en un ambiente estéril. Las muestras recolectadas en la solución RNAlater se mantuvieron a -80 °C hasta que se procesaron para el análisis de la expresión génica mientras que las muestras conservadas en MEM se utilizaron para realizar estudios histológicos.

En primer lugar, las muestras se lavaron e hidrataron varias veces con MEM sin antibiótico para eliminar los eritrocitos y aislar el tejido venoso. Posteriormente, el tejido venoso se seccionó en fragmentos y las muestras se conservaron en fijador F13 (60% etanol, 20% metanol, 7% polietilenglicol y 13% agua destilada). Transcurrido el tiempo necesario para su fijación, se deshidrataron las muestras en concentraciones crecientes de alcohol y se sometieron a un proceso de inclusión en parafina, confeccionándose finalmente un bloque de parafina. A partir de estos bloques, se realizaron secciones finas de cinco micras en un micrótopo de rotación HM 350 s (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) y se recolectaron en portaobjetos impregnados con una solución de poli lisina al 10% para lograr la adherencia de las secciones a las diapositivas

### 2.3. Estudio de la expresión génica

La expresión de EGFL7 se estudió mediante el método de PCR en tiempo real (RT-qPCR), en el que se cuantificó la cantidad de ADN copia en cada uno de ellos. La extracción del ARN se realizó por el método del isotiocianato de guanidina-fenol-cloroformo, siguiendo el procedimiento descrito por Ortega et al. [17]. Los primers usados fueron diseñados por la herramienta Primer-BLAST [18] y la aplicación AutoDimer [19]. Se utilizó el sistema StepOnePlus™ con el método de la curva estándar relativa para llevar a cabo la PCR cuantitativa (qPCR). Se mezclaron 5 µL de cada muestra, previamente diluidos en agua libre de nucleasas, con 10 µL del agente intercalante IQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories), 1 µL de forward primer, 1 µL de reverse primer y 3 µL de agua libre de DNAsas y RNAsas en placa MicroAmp® de 96 pocillos (Applied Biosystems-Life Technologies), obteniendo un volumen final de 20 µL. Los resultados finales se normalizaron y compararon con la expresión génica constitutiva de GAPDH (Tabla I). Los datos obtenidos de cada

gen se interpolaron en una curva estándar. En la placa de 96 pocillos, las muestras se triplicaron y duplicaron en una curva estándar, y los dos pocillos restantes se llenaron con controles negativos.

**Tabla I.** Secuencias de cebadores utilizadas en RT-qPCR y temperatura (Tm).

Gen	Sercuencia directa (5'→3')	Sercuencia inversa (5'→3')	Temperatura
GAPDH	GGAAGGTGAAGGTCG GAGTCA	GTCATTGATGGCAACAAT ATCCACT	60 °C
EGFL7	TCGTGCAGCGTGTGTA CCAG	GCGGTAGGCGGTCCTATA GATG	59 °C

#### 2.4. Estudio de la expresión proteica

La reacción antígeno-anticuerpo se detectó por el método ABC (complejo avidina-biotina) con peroxidasa o fosfatasa alcalina como cromógeno, de acuerdo con el protocolo descrito por Ortega et al. [20]. El bloqueo de los sitios de unión no específicos se llevó a cabo con albúmina de suero bovino (BSA) al 3% y PBS durante la noche a 4°C (Tabla IIa). La incubación con el anticuerpo secundario unido a biotina se diluyó en PBS durante una hora y media a temperatura ambiente (Tabla IIb).

Se llevó a cabo una incubación con el conjugado de avidina-peroxidasa ExtrAvidin®-Peroxidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) durante 60 minutos a temperatura ambiente (diluido a 1 : 1200 en PBS). La incubación se reveló con el sustrato cromogénico de diaminobencidina (Kit DAB, SK-4100) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE. UU.). El sustrato cromogénico se preparó inmediatamente antes de la exposición (5 mL de agua destilada, 2 gotas de tampón, 4 gotas de DAB y 2 gotas de peróxido de hidrógeno). Esta técnica permite una mancha de color marrón. Para obtener el contraste con la tinción de los núcleos, se realizó una incubación en hematoxilina de Carazzi durante 5-15 minutos montada en medio acuoso con Plasdon. En todos los estudios genéticos se utilizaron como control negativo secciones del mismo tejido, en las que se sustituyó la incubación con el anticuerpo primario por incubación con solución de bloqueo.

**Tabla II.** Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para el análisis de inmunohistoquímica.

##### A. Anticuerpo primario

Anticuerpo	Especie	Dilución	Proveedor	Nº categoría	Especificaciones del protocolo
EGFL7	Conejo (monoclonal)	1:500	Abcam	ab256451	EDTA (pH 9) antes de la incubación con solución de bloqueo

##### B. Anticuerpo secundario

Anticuerpo	Especie	Dilución	Proveedor	Nº categoría	Especificaciones del protocolo
IgG	Ratón (Policlonal)	1:1000	Sigma-Aldrich; Merck KGaA	B5283	NA

#### 2.5. Análisis estadístico

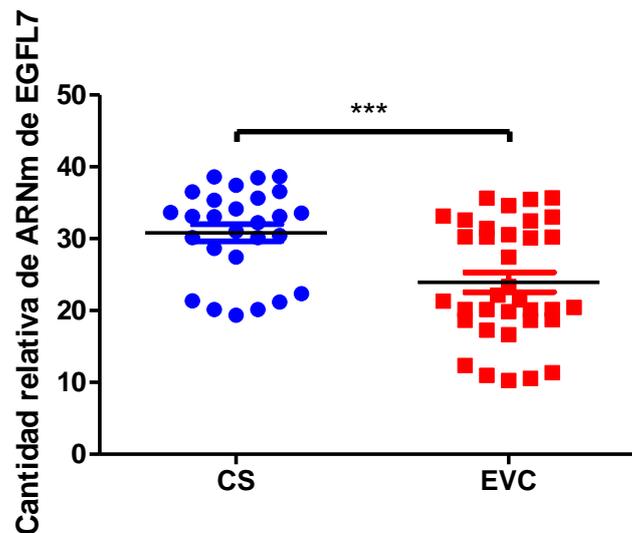
Para el análisis estadístico se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism® 5.1 y se aplicó la U de Mann-Whitney y la prueba de  $\chi^2$  de Pearson. Los datos se expresan como mediana con rango intercuartílico (RIC). Las barras de error en las cifras se expresan con IQR. Los valores de significación se establecieron en \*p < 0,05, \*\*p < 0,005 y \*\*\*p < 0,001.

Las preparaciones se examinaron bajo un microscopio óptico Zeiss Axiophot (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania). Dado el importante papel de las proteínas involucradas, la evaluación de los resultados histológicos se realizó por la intensidad de expresión para la tinción inmunohistoquímica con una puntuación de 1 a 3. En adelante, las muestras histológicas de los pacientes se clasificaron como negativas (0) o positivas (1-3) siguiendo el método de puntuación del IRS, como se describe en trabajos previos [21]. Para cada grupo de sujetos establecido, se examinaron 7 campos de microscopía seleccionados al azar en cada una de las 5 secciones. Los sujetos fueron clasificados como positivos cuando la proporción promedio de la muestra etiquetada fue mayor o igual al 5% de la muestra total. Esto se hizo calculando el porcentaje total de tejido marcado en cada campo de microscopía para obtener el valor de la media para la muestra de estudio según lo descrito por Cristóbal et al. [22]. La observación y cuantificación de las muestras fue realizada de forma independiente por dos investigadores.

### 3. Resultados

#### 3.1. Los pacientes con Enfermedad Venosa Crónica muestran una disminución de la expresión génica de EGFL7 en la pared venosa.

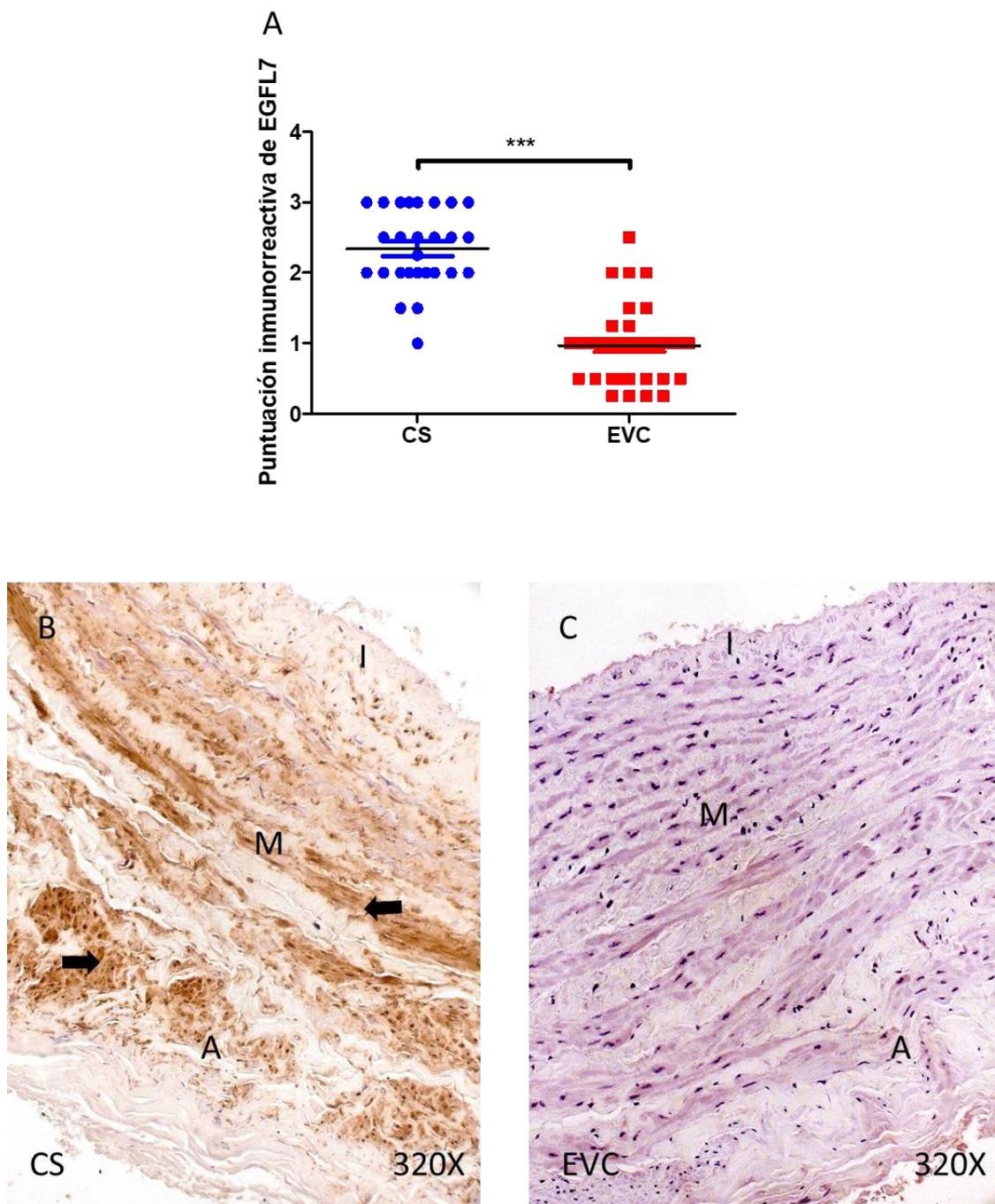
Nuestros resultados muestran como los pacientes con EVC muestran una disminución significativa de los niveles de expresión génica de EGFL7 en la pared de la vena safena mayor mediante RT-qPCR. La mediana de los niveles de expresión génica de EGFL7 fue de 33.048 [19.365-38.651] UA en pacientes CS, mientras en los pacientes EVC fue de 21.459 [10.270-35.693] UA. El valor de p fue de 0.006 (\*\*), Figura 1.



**Figura 1.** Expresión de ARNm para EGFL7 en CS (controles sanos) y pacientes EVC (enfermedad venosa crónica) en unidades arbitrarias mediante RT-qPCR.

#### 3.2. Los pacientes con Enfermedad Venosa Crónica muestran una disminución de la expresión proteica de EGFL7 en la pared venosa.

El estudio de la expresión proteica de EGFL7 mediante técnicas de inmunohistoquímica mostró una disminución significativa en pacientes ECV en comparación con CS (Figura 2A). La mediana de la puntuación inmunoreactiva fue de 2.500 [1.000-3.000] en CS, mientras que en pacientes EVC fue de 1.000 [0.250-2.500]. El valor de p fue  $p < 0,0001$  (\*\*\*). El estudio histopatológico de EGFL7 mostró como su localización estaba presente en las tres tunicas de la pared venosa de la vena safena mayor en ambos grupos de estudio (Figura 2B y 2C).



**Figura 2.** A. Puntuación inmunoreactiva para EGFL7 en CS (controles sanos) y pacientes EVC (enfermedad venosa crónica) en las tres túnicas de pared venosa. B-C. Imágenes que muestran inmunotinción para EGFL7 en CS (B) y pacientes EVC (C) en las tres túnicas de pared venosa (flecha). I: túnica íntima; M: túnica media; A: túnica adventicia.

#### 4. Discusión

La EVC se asocia con una gran variedad de cambios en la pared venosa que promueve la aparición de VV y la progresión a estadios más avanzados ([23–26]). Las alteraciones que acontecen en la MEC de las venas patológicas son numerosas, llevando a una dilatación y esclerosis del tejido, cambios microcirculatorios así como una menor contractilidad y elasticidad del mismo [11]. En este

sentido, nuestro estudio sugiere la implicación de EGFL7 en el desarrollo de la EVC, asociándose con otros cambios previamente descritos.

EGFL7 es un modulador clave de múltiples funciones tisulares. Por una parte, se ha descrito el papel central que tiene este componente en el proceso de angiogénesis, especialmente en el desarrollo y la patología del sistema vascular [27]. A nivel molecular, EGFL7 se relaciona con la actividad de la vía NOTCH, un componente clave en el funcionamiento del endotelio y las células musculares lisas vasculares [28]. Modelos knock out *in vitro* para EGFL7 suprimía la angiogénesis de y los efectos mediados por VEGF (Vascular endothelial growth factor), además de afectar al comportamiento de las células endoteliales y promover la inflamación [29]. De igual manera, la expresión de EGFL-7 parece ser un factor de protección frente a situaciones de hipoxia e isquemia, tal y como demuestran distintos modelos *in vivo* e *in vitro* ([27]. En esta línea, trabajos previos han demostrado la implicación de la hipoxia y de la alteración de del proceso de angiogénesis en la fisiopatología de la EVC [30,31], mostrando una relación estrecha que podría estar mediada por la la disminución de la expresión de EGFL7.

Por otro lado, se ha estudiado el papel que tiene EGFL7 en la regulación del componente elástico, actuando a través de la familia de las lisil-oxidasas [15]. Las alteraciones en el componente elástico suponen un importante mecanismo fisiopatogénico de la EVC. Por ejemplo, se ha descrito como el proceso de varicogénesis está parcialmente mediado por cambios en la estructura y redistribución del componente elástico en la pared venosa, observándose un aumento de las mismas en regiones engrosadas de la túnica íntima acompañadas de una disminución de las mismas en la túnica media, especialmente en regiones escleróticas [32]. Mas en detalle, se ha visto como existe una gran variedad de cambios en distintos componentes implicados en la homeostasis del componente elástico en comparación con venas no patológicas, destacando cambios en la tropoelastina, fibrilina 1, elastina, el factor de crecimiento tumoral  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ) o la proteínas de unión a TGF-  $\beta$  latente 2 (LTBP-2) [33]. De manera similar, la desregulación de los componentes elásticos parece exacerbarse en etapas avanzadas de la enfermedad, mostrando igualmente una expresión diferencial en pacientes jóvenes (menos de 50 años) versus pacientes mayores (más de 50 años) [13]. En esta línea, la desregulación de EGFL7 puede ser un elemento notable de gran relevancia en la desregulación del componente elástico que aparece en las venas afectadas en pacientes con EVC, tal y como han demostrado trabajos anteriores en otros tejidos [16].

Finalmente, algunos investigadores han sugerido que los cambios en la expresión de EGFL7 puede estar regulado por una proteína conocida como castor zinc finger 1 (CASZ1), que juega un papel central en la homeostasis vascular [34]. La EVC tiene un importante componente ambiental, pero también genético (Aproximadamente entorno a un 17% [35]. En este sentido, se ha descrito la importancia de algunos polimorfismos en la mayor predisposición a sufrir de esta patología [36]. Existe una variante polimórfica de CASZ1 conocida como el alelo rs11121615 C que se encuentra asociado con formas más severas de la EVC, regulando la expresión de EGFL7 que a su vez controla RhoA y la expresión de una gran variedad de genes dependientes del factor NF- $\kappa$ B [37].

## 5. Conclusiones

En su conjunto, nuestro trabajo apoya el papel de EGFL7 en el desarrollo de la EVC, mostrando una menor expresión en venas patológicas. Futuros estudios son necesarios para profundizar en las implicaciones de estos cambios en el tejido venoso asociado a la EVC, así como el desarrollo de posibles estrategias dirigidas a esta diana.

**Financiación:** Este estudio (PI21/001244) ha sido subvencionado por el Instituto de Salud Carlos III (Plan Estatal de I+D+I 2013–2016) y cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional “Un camino para alcanzar Europa” (FEDER) y B2017/BMD-3804 MITIC-CM.

**Contribución de los autores:** Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito.

**Declaración de la Junta de Revisión Institucional:** El estudio se realizó de acuerdo con los principios éticos básicos de autonomía, beneficencia, no maleficencia y justicia distributiva, y su desarrollo siguió las reglas de Buena Práctica Clínica, principios contenidos en la Declaración más reciente. de Helsinki (2013) y el Convenio de Oviedo (1997). Los datos e información recabados cumplieron con la legislación vigente en materia de

protección de datos (Ley Orgánica 3/5 de diciembre de 2018 de Protección de Datos de Carácter Personal y Garantía de los Derechos Digitales y Reglamento (UE) 2016/679) aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital de la Defensa Gómez-Ulla-UAH (37/17).

**Declaración de consentimiento informado:** Se obtuvo el consentimiento informado de todos los sujetos involucrados en el estudio.

**Declaración de disponibilidad de datos:** Los datos utilizados para respaldar los hallazgos del presente estudio están disponibles a pedido del autor correspondiente.

**Conflictos de interés:** Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

## Abreviaturas

EVC= Enfermedad venosa crónica

VVs= Venas varicosas

MEC= Matriz extracelular

CS= Control sin enfermedad venosa

IMC= Índice de masa corporal

RT-qPCR= PCR en tiempo real

EGFL7=Epidermal growth factor-like domain-containing protein 7

## Referencias Bibliográficas

1. Depopas, E.; Brown, M. Varicose Veins and Lower Extremity Venous Insufficiency. *Seminars in Interventional Radiology* **2018**, *35*, 56–61, doi:10.1055/s-0038-1636522.
2. Chwała, M.; Szczeklik, W.; Szczeklik, M.; Aleksiejew-Kleszczyński, T.; Jagielska-Chwała, M. Varicose Veins of Lower Extremities, Hemodynamics and Treatment Methods. *Adv Clin Exp Med* **2015**, *24*, 5–14, doi:10.17219/ACEM/31880.
3. Rabe, E.; Berboth, G.; Pannier, F. [Epidemiology of Chronic Venous Diseases]. *Wien Med Wochenschr* **2016**, *166*, 260–263, doi:10.1007/S10354-016-0465-Y.
4. Ortega, M.A.; Asúnsolo, Á.; Romero, B.; Álvarez-Rocha, M.J.; Sainz, F.; Leal, J.; Álvarez-Mon, M.; Buján, J.; García-Honduvilla, N. Unravelling the Role of Mapks (Erk1/2) in Venous Reflux in Patients with Chronic Venous Disorder. *Cells Tissues Organs* **2019**, *206*, 272–281, doi:10.1159/000500449.
5. Vlajinac, H.D.; Radak, D.J.; Marinković, J.M.; Maksimović, M.Ž. Risk Factors for Chronic Venous Disease. *Phlebology* **2012**, *27*, 416–422, doi:10.1258/phleb.2011.011091.
6. Vuylsteke, M.E.; Thomis, S.; Guillaume, G.; Modliszewski, M.L.; Weides, N.; Staelens, I. Epidemiological Study on Chronic Venous Disease in Belgium and Luxembourg: Prevalence, Risk Factors, and Symptomatology. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* **2015**, *49*, 432–439, doi:10.1016/j.ejvs.2014.12.031.
7. Criqui, M.H.; Denenberg, J.O.; Bergan, J.; Langer, R.D.; Fronek, A. Risk Factors for Chronic Venous Disease: The San Diego Population Study. *Journal of Vascular Surgery* **2007**, *46*, 331–337, doi:10.1016/j.jvs.2007.03.052.
8. Raju, S.; Knight, A.; Lamanilao, L.; Pace, N.; Jones, T. Peripheral Venous Hypertension in Chronic Venous Disease. *Journal of Vascular Surgery: Venous and Lymphatic Disorders* **2019**, *7*, 706–714, doi:10.1016/j.jvsv.2019.03.006.
9. Raffetto, J.D.; Mannello, F. Pathophysiology of Chronic Venous Disease. *International Angiology* **2014**, *33*, 212–221.
10. Santler, B.; Goerge, T. Chronic Venous Insufficiency – a Review of Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. *JDDG - Journal of the German Society of Dermatology* **2017**, *15*, 538–556, doi:10.1111/ddg.13242.
11. Ortega MA, Fraile-Martínez O, García-Montero C, Álvarez-Mon MA, Chaowen C, Ruiz-Grande F, Pekarek L, Monserrat J, Asúnsolo A, García-Honduvilla N, Álvarez-Mon M, Bujan J. Understanding Chronic Venous Disease: A Critical Overview of Its Pathophysiology and Medical Management. *J Clin Med* **2021**, *10*, doi:10.3390/JCM10153239.
12. Ortega, M.A.; Fraile-Martínez, O.; García-Montero, C.; Pekarek, L.; Alvarez-Mon, M.A.; Guijarro, L.G.; del Carmen Boyano, M.; Sainz, F.; Álvarez-Mon, M.; Buján, J.; et al. Tissue Remodelling and Increased DNA

- Damage in Patients with Incompetent Valves in Chronic Venous Insufficiency. *J Cell Mol Med* **2021**, *25*, 7878–7889, doi:10.1111/JCMM.16711.
13. Ortega, M.A.; Fraile-Martínez, O.; García-Montero, C.; Ruiz-Grande, F.; Álvarez-Mon, M.A.; Monserrat, J.; Guijarro, L.G.; Coca, S.; Álvarez-Mon, M.; Bujan, J.; et al. Contribution of the Elastic Component and Venous Wall Arterialization in Patients with Venous Reflux. *Journal of Personalized Medicine* **2022**, *12*, 12, doi:10.3390/JPM12020260.
  14. Hong, G.; Kuek, V.; Shi, J.; Zhou, L.; Han, X.; He, W.; Tickner, J.; Qiu, H.; Wei, Q.; Xu, J. EGFL7: Master Regulator of Cancer Pathogenesis, Angiogenesis and an Emerging Mediator of Bone Homeostasis. *J Cell Physiol* **2018**, *233*, 8526–8537, doi:10.1002/JCP.26792.
  15. Lelièvre, E.; Hinek, A.; Lupu, F.; Buquet, C.; Soncin, F.; Mattot, V. VE-Statin/Egfl7 Regulates Vascular Elastogenesis by Interacting with Lysyl Oxidases. *EMBO J* **2008**, *27*, 1658–1670, doi:10.1038/EMBOJ.2008.103.
  16. Ortega MA, Asúnsolo Á, Fraile-Martínez O, Sainz F, Saez MA, Bravo C, De León-Luis JA, Alvarez-Mon MA, Coca S, Álvarez-Mon M, Buján J, García-Honduvilla N. An Increase in Elastogenic Components in the Placental Villi of Women with Chronic Venous Disease during Pregnancy Is Associated with Decreased EGFL7 Expression Level. *Mol Med Rep* **2021**, *24*, doi:10.3892/MMR.2021.12195.
  17. Ortega MA, Asúnsolo Á, Álvarez-Rocha MJ, Romero B, De León-Luis J, Álvarez-Mon M, Buján J, García-Honduvilla N. Remodelling of Collagen Fibres in the Placentas of Women with Venous Insufficiency during Pregnancy. *Histol Histopathol* **2018**, *33*, 567–576, doi:10.14670/HH-11-948.
  18. Ye, J.; Coulouris, G.; Zaretskaya, I.; Cutcutache, I.; Rozen, S.; Madden, T.L. Primer-BLAST: A Tool to Design Target-Specific Primers for Polymerase Chain Reaction. *BMC Bioinformatics* **2012**, *13*, 134, doi:10.1186/1471-2105-13-134.
  19. Vallone, P.M.; Butler, J.M. AutoDimer: A Screening Tool for Primer-Dimer and Hairpin Structures. *Biotechniques* **2004**, *37*, 226–231, doi:10.2144/04372st03.
  20. Ortega MA, Fraile-Martínez O, Saez MA, Álvarez-Mon MA, Gómez-Lahoz AM, Bravo C, Luis JAL, Sainz F, Coca S, Asúnsolo Á, Monserrat J, Guijarro LG, Álvarez-Mon M, Bujan J, García-Honduvilla N. Abnormal Proinflammatory and Stressor Environmental with Increased the Regulatory Cellular IGF-1/PAPP-A/STC and Wnt-1/ $\beta$ -Catenin Canonical Pathway in Placenta of Women with Chronic Venous Disease during Pregnancy. *Int J Med Sci* **2021**, *18*, 2814–2827, doi:10.7150/IJMS.58992.
  21. Ortega, M.A.; Pekarek, L.; Garcia-Montero, C.; Fraile-Martinez, O.; Saez, M.A.; Asúnsolo, A.; Alvarez-Mon, M.A.; Monserrat, J.; Coca, S.; Toledo-Lobo, M.V.; et al. Prognostic Role of IRS-4 in the Survival of Patients with Pancreatic Cancer. *Histol Histopathol* **2022**, 18432, doi:10.14670/HH-18-432.
  22. Cristóbal, L.; Ortega, M.A.; Asúnsolo, Á.; Romero, B.; Álvarez-Mon, M.; Buján, J.; Maldonado, A.A.; García-Honduvilla, N. Human Skin Model for Mimic Dermal Studies in Pathology with a Clinical Implication in Pressure Ulcers. *Histology and Histopathology* **2018**, *33*, 959–970, doi:10.14670/HH-11-990.
  23. Ortega, M.A.; Asúnsolo, Á.; Pekarek, L.; Alvarez-Mon, M.A.; Delforge, A.; Sáez, M.A.; Coca, S.; Sainz, F.; Mon, M.Á.-; Buján, J.; et al. Histopathological Study of JNK in Venous Wall of Patients with Chronic Venous Insufficiency Related to Osteogenesis Process. *International Journal of Medical Sciences* **2021**, *18*, 1921–1934, doi:10.7150/ijms.54052.
  24. Ortega, M.A.; Fraile-Martínez, O.; Pekarek, L.; Alvarez-Mon, M.A.; Asúnsolo, Á.; Sanchez-Trujillo, L.; Coca, S.; Buján, J.; Álvarez-Mon, M.; García-Honduvilla, N.; et al. Defective Expression of the Peroxisome Regulators PPAR $\alpha$  Receptors and Lysogenesis with Increased Cellular Senescence in the Venous Wall of Chronic Venous Disorder. *Histol Histopathol* **2021**, 18322, doi:10.14670/HH-18-322.
  25. Ortega, M.A.; Fraile-Martínez, O.; García-Montero, C.; Ruiz-Grande, F.; Barrena, S.; Montoya, H.; Pekarek, L.; Zoullas, S.; Alvarez-Mon, M.A.; Sainz, F.; et al. Chronic Venous Disease Patients Show Increased IRS-4 Expression in the Great Saphenous Vein Wall. *J Int Med Res* **2021**, *49*, doi:10.1177/03000605211041275.
  26. Ortega, M.A.; Romero, B.; Asúnsolo, Á.; Sola, M.; Álvarez-Rocha, M.J.; Sainz, F.; Álvarez-Mon, M.; Buján, J.; García-Honduvilla, N. Patients with Incompetent Valves in Chronic Venous Insufficiency Show Increased Systematic Lipid Peroxidation and Cellular Oxidative Stress Markers. *Oxid Med Cell Longev* **2019**, 2019, doi:10.1155/2019/5164576.
  27. Nichol, D.; Stuhlmann, H. EGFL7: A Unique Angiogenic Signaling Factor in Vascular Development and Disease. *Blood* **2012**, *119*, 1345, doi:10.1182/BLOOD-2011-10-322446.
  28. Gridley, T. Notch Signaling in the Vasculature. *Curr Top Dev Biol* **2010**, *92*, 277, doi:10.1016/S0070-2153(10)92009-7.

29. Usuba, R.; Pauty, J.; Soncin, F.; Matsunaga, Y.T. EGFL7 Regulates Sprouting Angiogenesis and Endothelial Integrity in a Human Blood Vessel Model. *Biomaterials* **2019**, *197*, 305–316, doi:10.1016/j.BIOMATERIALS.2019.01.022.
30. Ortega, M.A.; Romero, B.; Asúnsolo, Á.; Sainz, F.; Martínez-Vivero, C.; Álvarez-Mon, M.; Buján, J.; García-Honduvilla, N. Behavior of Smooth Muscle Cells under Hypoxic Conditions: Possible Implications on the Varicose Vein Endothelium. *BioMed Research International* **2018**, *2018*, doi:10.1155/2018/7156150.
31. Sánchez, F.S.L.; Martínez, J.A.C.; Méndez-García, L.; García-Cenador, M.B.; Pericacho, M. Endoglin and Other Angiogenesis Markers in Recurrent Varicose Veins. *J Pers Med* **2022**, *12*, 528, doi:10.3390/JPM12040528.
32. Porto, L.C.; Alves Azizi, M.A.; Pelajo-Machado, M.; Matos da Silveira, P.R.; Lenzi, H.L. Elastic Fibers in Saphenous Varicose Veins. *Angiology* **2002**, *53*, 131–140, doi:10.1177/000331970205300202.
33. Buján, J.; Gimeno, M.J.; Jiménez, J.A.; Kielty, C.M.; Mecham, R.P.; Bellón, J.M. Expression of Elastic Components in Healthy and Varicose Veins. *World Journal of Surgery* **2003**, *27*, 901–905, doi:10.1007/s00268-003-6897-8.
34. Charpentier, M.S.; Christine, K.S.; Amin, N.M.; Dorr, K.M.; Kushner, E.J.; Bautch, V.L.; Taylor, J.M.; Conlon, F.L. CASZ1 Promotes Vascular Assembly and Morphogenesis through the Direct Regulation of an EGFL7/RhoA-Mediated Pathway. *Developmental Cell* **2013**, *25*, 132–143, doi:10.1016/j.devcel.2013.03.003.
35. Fiebig, A.; Krusche, P.; Wolf, A.; Krawczak, M.; Timm, B.; Nikolaus, S.; Frings, N.; Schreiber, S. Heritability of Chronic Venous Disease. *Human Genetics* **2010**, *127*, 669–674, doi:10.1007/s00439-010-0812-9.
36. Bharath, V.; Kahn, S.R.; Lazo-Langner, A. Genetic Polymorphisms of Vein Wall Remodeling in Chronic Venous Disease: A Narrative and Systematic Review. *Blood* **2014**, *124*, 1242–1250, doi:10.1182/BLOOD-2014-03-558478.
37. Jones, G.T.; Marsman, J.; Pardo, L.M.; Nijsten, T.; de Maeseneer, M.; Phillips, V.; Lynch-Sutherland, C.; Horsfield, J.; Krysa, J.; van Rij, A.M. A Variant of the Castor Zinc Finger 1 (CASZ1) Gene Is Differentially Associated with the Clinical Classification of Chronic Venous Disease. *Scientific Reports* **2019**, *9*, doi:10.1038/S41598-019-50586-2.



© 2022 por los autores; Esta obra está sujeta a la licencia de Reconocimiento 4.0 Internacional de Creative Commons. Para ver una copia de esta licencia, visite <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.