

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA



Biomarcadores de estrés oxidativo y capacidad antioxidante plasmática en la insuficiencia venosa

TESIS DOCTORAL

ELIO MUJICA PACHECO

MADRID, 2011



Facultad de Medicina
Departamento de Fisiología

MARIA DEL CARMEN GONZÁLEZ GARCÍA, Profesora Titular del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid

GABRIEL ESPAÑA CAPARRÓS, Jefe de Servicio de Angiología y Cirugía Vascular del Hospital Moncloa de Madrid

LUIS A. CONDEZO-HOYOS, Responsable de investigación de la empresa GEC S.L. de Madrid

CERTIFICAN

Que Don **ELIO MUJICA PACHECO** ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado:
"Biomarcadores de estrés oxidativo y capacidad antioxidante plasmática en la insuficiencia venosa" con objeto de obtener el Grado de Doctor.

Y para que conste expedimos el presente certificado en Madrid a 3 de junio de 2011.

DIRECTORES



Dra. M. Carmen González García



Dr. Gabriel España Caparrós



Dr. Luis A. Condezo Hoyos



Facultad de Medicina
Departamento de Fisiología

MARIA DEL CARMEN GONZÁLEZ GARCÍA, Profesora Titular del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid

GABRIEL ESPAÑA CAPARRÓS, Jefe de Servicio de Angiología y Cirugía Vascular del Hospital Moncloa de Madrid

LUIS A. CONDEZO-HOYOS, Responsable de investigación de la empresa GEC S.L. de Madrid

CERTIFICAN

Que Don **ELIO MUJICA PACHECO** ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado:
“Biomarcadores de estrés oxidativo y capacidad antioxidante plasmática en la insuficiencia venosa” con objeto de obtener el Grado de Doctor.

Y para que conste expedimos el presente certificado en Madrid a 3 de junio de 2011.

DIRECTORES

Dra. M. Carmen González García

Dr. Gabriel España Caparrós

Dr. Luis A. Condezo Hoyos

Av. del Arzobispo Morcillo, s/n. 28029 Madrid. Teléfonos 914975300 – 914975306. FAX 914975478

Este trabajo ha sido financiado con ayudas de la Universidad Autónoma de Madrid "Patología venosa y patología del pie diabético" (UAM/32) y la empresa GEC S.L.

Dedicatorias

A Dios por darme la oportunidad de vivir, darme una maravillosa familia y estar presente en todos los momentos de nuestras vidas.

A mi madre por ser un ejemplo de bondad y humanidad que sobrepasa los límites del sacrificio por sus hijos y todas las personas que la rodean y tal vez por ser la responsable que yo sea el médico de la familia.

A Natallia, mi amada esposa, por estar a mi lado en todos los momentos y vicisitudes de la vida, por creer en mí, en nuestro proyecto, demostrando fortaleza y tenacidad que me impulsa a seguir bregando por el camino de la vida y como complemento admiro su inmenso amor por los aspectos esenciales de la vida y de la naturaleza.

A nuestro futuro Nicolás que ya es el motor y objetivo principal de nuestra felicidad, que espero que vea la luz de la vida con esperanza, justicia y sea capaz de convertir sus anhelos en realidad.

Agradecimientos

De manera muy especial expreso mi mayor reconocimiento al Dr. Gabriel España Caparrós, por haberme permitido acceder a los conocimientos del avance actual de la Angiología y la Cirugía Vascular en España y ser esencial e importante en la concreción de esta tesis.

A la Dra. M. Carmen González García por haber puesto su máxima dedicación, conocimientos, paciencia y sabiduría en el desarrollo de este trabajo.

A Luis Alberto Condezo-Hoyos, por haber dedicado su gran capacidad investigadora, dedicación y trabajo. Compañero y guía fundamental en la realización de esos apasionantes experimentos y pruebas de laboratorio, en donde pude compartir momentos agotantes y a su vez de alegría y entusiasmo por los resultados hallados.

A la Dra. Silvia Arribas por el entusiasmo y las ideas plasmadas durante las largas horas de trabajo en esta tesis.

ÍNDICE

ÍNDICE	Página
ABREVIATURAS	i
RESUMEN	iv
INTRODUCCIÓN	1
A. INSUFICIENCIA VENOSA CRONICA	2
1. Breve reseña anatómica y funcional de la circulación venosa de las extremidades inferiores.	2
2. Definición.....	4
3. Clasificación de la insuficiencia venosa crónica.	5
4. Epidemiología y etiología.	7
5. Procesos inflamatorios e infiltración celular.	9
6. Cambios primarios en la pared de venas varicosas.	11
7. Tratamiento de la insuficiencia venosa crónica.	15
7.1. Cirugía.	15
7.2. Tratamiento farmacológico de la IVC.	16
8. Recidiva varicosa	17
8.1. Etiología de la recidiva varicosa.	18
B. ESTRÉS OXIDATIVO	20
1. Definición.....	20
2. Radicales libres biológicos	20
2.1. Radical anión superóxido	20
2.2. El radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$)	21
2.3. Radical peroxilo ($\text{ROO}\bullet$)	21
2.4. Óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$)	22
2.5. Anión peroxinitrito.....	22
3. Sistemas enzimáticos productores de ROS / RNS.....	23
3.1. NADPH oxidasa	24
3.2. Xantina oxidasa	25
3.3. Mieloperoxidasa.....	25
3.4. Sintasa de óxido nítrico.....	25

4. Principales mecanismos de defensa antioxidante	26
4.1. Sistemas de defensa antioxidante enzimáticos	27
4.1.1. Superóxido dismutasa (SOD)	27
4.1.2. Catalasa.....	28
4.1.3. Glutación peroxidasa.....	28
4.2. Sistemas de defensa antioxidantes no enzimáticos de bajo peso molecular	29
4.2.1. Glutación	29
4.2.2. Ácido ascórbico	30
C. BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN SITUACIONES PATOLÓGICAS.....	32
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	39
MATERIALES Y MÉTODOS	42
A. MATERIALES	43
1. Reactivos.....	43
2. Equipos	44
3. Sujetos de estudio	45
B. METODOS	46
1. Diagnóstico clínico y eco doppler	46
2. Extracción de la sangre	46
3. Preparación del plasma	47
4. Determinación de antioxidantes no enzimáticos	47
4.1. Glutación reducido (GSH) y oxidado (GSSG)	47
4.1.1. Protocolo experimental	47
4.1.2. Cálculos.....	48
4.2. Acido úrico	48
4.2.1. Protocolo experimental	49
4.2.2. Cálculos.....	49
5. Determinación de la capacidad antioxidante no enzimática total	50
5.1. Método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)	50
5.1.1. Protocolo experimental	51
5.1.2. Cálculo del valor ORAC	51

5.2. Método TAC (Total Antioxidative Capacity) basado en la inhibición de la luminiscencia	52
5.2.1. Protocolo experimental	53
5.2.2. Cálculo del valor TAC	54
6. Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes	56
6.1. Catalasa	56
6.1.1. Protocolo experimental	56
6.1.2. Cálculos	57
7. Determinación de la oxidación de proteínas	57
7.1. Carbonilos totales	57
7.2. Malondialdehído (MDA)	58
7.3. Productos avanzados de oxidación (Advanced Oxidation Products, AOPP)	59
8. Determinación de enzimas productoras de radicales libres	59
8.1. Xantina oxidasa	59
8.2. Mieloperoxidasa	60
9. Actividad de metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9	60
9.1. Preparación de geles en gradiente	61
9.2. Protocolo experimental	62
9.3. Cálculos	63
10. Determinación del contenido de proteínas	64
11. Análisis estadístico	64
11.1. Estadística descriptiva, prueba de comparación de media, análisis de regresión y pruebas de normalidad	64
11.2. Cálculo del indicador global de estrés oxidativo plasmático en insuficiencia venosa	64
RESULTADOS	67
A. CARACTERIZACIÓN DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO	68
1. Inclusión de pacientes.	68
2. Estudio Eco-Doppler color.	69
2.1. Características de los sujetos control	69
2.2. Características de los pacientes con varices primarias	69
2.3. Características de los pacientes con varices recidivantes	70

B. ESTUDIO DEL ESTATUS ANTIOXIDANTE Y PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO PLASMÁTICO.....	71
1. Capacidad antioxidante no enzimática total del plasma.	71
1.1. Capacidad antioxidante total mediada mediante fluorescencia (ORAC)	71
1.2. Capacidad antioxidante total medida por luminiscencia (TAC)	74
2. Niveles de antioxidantes no enzimáticos plasmáticos	76
2.1. Glutatión reducido	76
2.2. Acido úrico	77
3. Actividad catalasa en el plasma.	78
4. Oxidación de proteínas plasmáticas	79
4.1. Proteínas carboniladas	79
4.2. Proteínas modificadas por MDA.	80
4.3. Productos avanzados de oxidación de proteínas (AOPP)	81
5. Actividad de enzimas productoras de radicales libres	82
5.1. Xantina oxidasa	82
5.2. Mieloperoxidasa	83
6. Actividad de las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9	83
C. INDICADOR GLOBAL DE ESTRÉS OXIDATIVO EN INSUFICIENCIA VENOSA	85
1. Análisis de normalidad de los parámetros.	85
2. Estandarización de los parámetros originales y normalizados	87
3. Cálculo del OXyVen.....	87
DISCUSIÓN	92
1. INSUFICIENCIA VENOSA CRÓNICA Y ESTRÉS OXIDATIVO.	93
2. DISEÑO DE BIOMARCADORES PLASMÁTICOS DE ESTRÉS EN IVC	93
3. CUANTIFICACIÓN DEL INDICADOR GLOBAL DE ESTRÉS OXIDATIVO OXYVEN.	96
4. ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS RELACIONADOS CON LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE NO ENZIMÁTICA.....	100
5. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LA CATALASA PLASMÁTICA.	102
6. ESTUDIO DE BIOMARCADORES DE DAÑO A PROTEÍNAS..	103
7. ESTUDIO DE ENZIMAS PRODUCTORAS DE RADICALES LIBRES Y ESPECIES OXIDANTES..	77

8. METALOPROTEINASAS PLASMÁTICAS.	77
9. LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y PERSPECTIVAS FUTURAS..	77
CONCLUSIONES	108
REFERENCIAS	111
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	131

ABREVIATURAS

AGEs	Productos avanzados de glicación
AOPP	Productos avanzados de oxidación
ASA	Sistema de clasificación que utiliza la American Society of Anesthesiologists para estimar el riesgo que plantea la anestesia para los distintos estados del paciente.
C.E.A.P.	Clinical Etiologic Anatomic Pathophysiologic
DNPH	Dinitrofenilhidrazina
EAO	Enfermedades asociadas con estrés oxidativo.
ECM	Matriz extracelular
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HRP	Peroxidasa de rábano
IVC	Insuficiencia venosa crónica
LOO [•]	Radicales lipídicos
LOOH	Hidroperóxidos de ácidos grasos
MDA	Malondialdehído
MMPs	Metaloproteinasas de matriz
MPO	Mieloperoxidasa
NAD(P)H	Dinucleótido fosfato de adenin nicotinamida
NEM	N-Etilmaleimida
NO [•]	Óxido nítrico
NOSs	Sintasas de óxido nítrico

$O_2^{\bullet -}$	Radical anión superóxido
$\bullet OH$	Radical hidroxilo
$ONOO^-$	Anión peroxinitrito
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
OXY-SCORE	Indicador integral que tiene en cuenta la naturaleza multifactorial del estrés oxidativo
RNS	Especies reactivas dependientes de nitrógeno
$ROO^\bullet$	Radical peroxilo
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SOD	Superóxido dismutasa
TAC	Capacidad antioxidante total
TBA	Método del ácido tiobarbitúrico
TIMPs	Inhibidores tisulares endógenos de metaloproteinasas
VP	Pacientes con varices primarias
VR	Pacientes con varices recidivantes
VS	Vena safena
VSE	Vena safena menor o externa
VSI	Vena safena mayor o vena safena interna
XO	Xantina oxidasa

RESUMEN

La insuficiencia venosa crónica es la incapacidad del sistema venoso de conducir el flujo en sentido centrípeto, hacia el corazón. La manifestación clínica más común son las venas varicosas, en las que el flujo está distorsionado, produciéndose estancamiento de la sangre, hipertensión y debilitamiento de la pared venosa.

Numerosos factores contribuyen a esta enfermedad, entre los que cabe destacar la historia familiar, el género –siendo más prevalente en mujeres-, la gestación y la edad, entre otros. Es de especial relevancia el hecho de que la insuficiencia venosa crónica, aunque no representa una patología de elevada mortalidad, si es una enfermedad de elevada prevalencia, que afecta en gran medida a población activa, particularmente a profesionales que están mucho tiempo en bipedestación, lo que contribuye en gran medida al absentismo laboral. Además no existe un tratamiento farmacológico efectivo, por lo que la única solución es la cirugía. Este hecho junto con la alta prevalencia de recidivas, que requieren una segunda intervención, hace que la insuficiencia venosa crónica constituya un problema socio sanitario importante.

Los mecanismos responsables de la insuficiencia venosa crónica, no están totalmente esclarecidos, como tampoco por qué algunos pacientes presentan recidivas aun tras una intervención quirúrgica con éxito. Entre las hipótesis que se han sugerido se encuentran la insuficiencia valvular primaria, la infiltración de células inflamatorias y el debilitamiento de la pared venosa. Todos estos posibles mecanismos tienen en común la elevada producción de radicales libres que contribuyen a que la pared de las varices se encuentre en un estado de estrés oxidativo. Sin embargo no se conoce si éste se refleja en el plasma.

El objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido estudiar el estado oxidativo en el plasma de pacientes con insuficiencia venosa crónica, tanto aquellos de varices primarias como con varices recidivantes. Para ello se han determinado mediante diversos métodos fluorimétricos y espectrofotométricos, diversos biomarcadores de estrés oxidativo. Por una parte se han estudiado marcadores

de daño oxidativo, evaluando la oxidación a proteínas plasmáticas y la actividad de enzimas productoras de radicales libres. Asimismo, se han determinado varios sistemas antioxidante plasmáticos no enzimáticos (glutatión reducido y ácido úrico), y enzimáticos (catalasa), así como la capacidad antioxidante total del plasma.

Los datos demuestran que existen varios biomarcadores de estrés oxidativo cuantificables en el plasma de pacientes en estadios tempranos de la insuficiencia venosa. Con estos parámetros se ha calculado un indicador de estrés oxidativo global de insuficiencia venosa (OXYVen), el cual permite establecer diferencias altamente significativas entre pacientes con insuficiencia venosa y controles sanos. Asimismo se detectan algunas diferencias entre los sujetos con varices primarias y recidivantes.

Los datos de esta Tesis Doctoral permiten concluir que el indicador global de estrés oxidativo OXYVen puede ser un útil en la clínica como marcador de inicio o evolución de la insuficiencia venosa crónica.

INTRODUCCIÓN

A. INSUFICIENCIA VENOSA CRONICA

1. Breve reseña anatómica y funcional de la circulación venosa de las extremidades inferiores.

El flujo sanguíneo venoso en los miembros inferiores tiene lugar a través de dos sistemas: el superficial y el profundo, interconectados por numerosas venas perforantes. El sistema superficial drena la piel y el tejido subcutáneo. El sistema venoso profundo, que es el responsable del 90% del retorno venoso, se encuentra por debajo de la fascia que rodea los músculos del muslo y de la pierna. Los músculos esqueléticos que rodean las venas se comportan como bombas de compresión y vaciado, actuando como la principal fuerza impulsora del flujo sanguíneo venoso. Entre el sistema superficial y el profundo existen comunicaciones a través de venas perforantes (Figura 1).

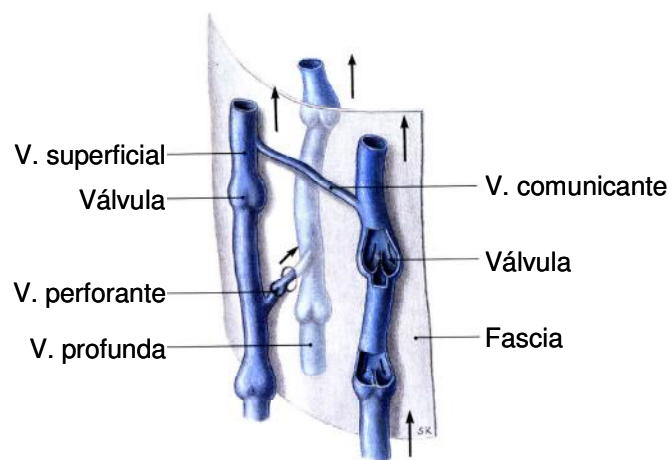


Figura 1. Clasificación de las venas del miembro inferior (Fuente: Sobotta: Atlas de anatomía. 2006).

El sistema venoso superficial está constituido por una extensa red de venas entre las que destacan la vena safena mayor o vena safena interna (VSI) que se origina en el dorso del pie, pasa por delante del maléolo medial y asciende hasta unirse con la vena femoral mediante el cayado de la safena que atraviesa la fascia cribiforme, por debajo del ligamento inguinal en el triángulo de Scarpa

o región inguinocrural; y la vena safena menor o externa (VSE) que se inicia en la región retro maleolar externa del pie, asciende por la parte posterior de la pierna, se coloca en el surco que separa los músculos gemelos y alcanza el hueco poplíteo, perfora la fascia y desemboca en la vena poplítea.

Las venas del sistema venoso profundo siguen el trayecto de las arterias homónimas y de sus ramas. Se encuentran en el interior de una vaina vascular con la arteria, cuyas pulsaciones también ayudan a comprimir y movilizar la sangre que contienen. Las venas profundas se organizan en un sistema principal y un sistema muscular. El sistema principal está constituido por tres troncos: tibioperoneo, poplíteo y femoral. El tibioperoneo se forma tras atravesar la membrana interósea de la pierna; se une al tronco tibioperoneo y forma la vena poplítea. La vena poplítea se extiende desde el anillo del soleo, que continuando por la porción medial del hueco poplíteo y tras atravesar el anillo del tercer aductor o anillo de Hunter, se continúa como vena femoral, ésta última sigue el trayecto del conducto femoral hasta el anillo crural donde se transforma en vena ilíaca externa. El sistema muscular está constituido principalmente por el complejo venoso del soleo y el de los gemelos que drenan en el grupo tibioperoneo, y el de las venas femorales que drenan en la vena ilíaca externa.

El sistema perforante está constituido por venas que drenan la sangre de la superficie hacia la profundidad, todas poseen válvulas, en general provienen de las ramas colaterales de las safenas y no del tronco de éstas, por lo tanto, habitualmente no son destruidas cuando se efectúa la escisión total de las safenas. Se han descrito más de 150 venas perforantes en los miembros inferiores, aunque son pocas las que tienen importancia clínica. Entre ellas cabe destacar la vena perforante de Dodd en el muslo, la perforante de Hunter en tercio distal de muslo, las de Boyd en el tercio superior de la pierna y las tres perforantes de Cocketts en la mitad inferior de la pierna.

Las válvulas venosas son repliegues del endotelio con senos valvulares en forma de copa que se llenan desde arriba. Cuando están llenos, las cúspides de las válvulas ocluyen la luz de la vena, con lo que se impide el flujo distal de sangre. Además, las válvulas segmentan la columna sanguínea de forma que se reduce la presión retrógrada, lo que permite que el retorno venoso esté asegurado desde abajo hacia arriba y de la superficie a la profundidad, impidiendo el reflujo distal y facilitando que el bombeo músculo-venoso supere la fuerza de la gravedad para retornar la sangre al corazón (Zbrodowski et al., 1995, Putz et al., 2006, Eklöf, 2007).

Las válvulas venosas se hallan en un mayor número en el sistema venoso profundo que el superficial y más en las regiones distales que las proximales. En cuanto a su distribución se ha descrito una válvula en las venas ilíacas, una válvula en la vena femoral común, entre tres a cinco en la vena femoral superficial, una o dos en la vena poplitea, las venas tibiales posteriores presentan de 9 a 19 válvulas, las tibiales anteriores de 9 a 11, en las peroneas unas 7, en las venas perforantes entre 1 a 3, la VSI de 6 a 14 y la VSE 7 válvulas (Raju-Villavicencio, 1999).

2. Definición.

La insuficiencia venosa crónica (IVC), o reflujo venoso, es la incapacidad del sistema venoso para conducir el flujo de sangre en dirección centrípeta, hacia el corazón con independencia de la posición y actividad del cuerpo. Esencialmente, la IVC se caracteriza por la existencia de reflujo o a la obstrucción del drenaje venoso o una combinación de ambas, entendiendo por reflujo la existencia de un flujo retrogrado en sentido contrario al fisiológico.

Una de las manifestaciones clínicas más comunes de la insuficiencia venosa son las venas varicosas. Las venas varicosas se encuentran en el sistema venoso superficial y están relacionadas con las venas principales -las venas safenas mayor y menor- así como con las venas tributarias (Eklöf, 2007).

3. Clasificación de la insuficiencia venosa crónica.

Durante mucho tiempo la clasificación de la IVC se realizó exclusivamente basándose en la apariencia de las venas varicosas. La clasificación más utilizada, particularmente en Europa, fue la de Widmer de 1978, que dividía la IVC en los siguientes estadios:

Estadio I. Edema y venas subcutáneas dilatadas con corona flebectásica.

Estadio II. Lesiones tróficas de la piel con áreas depigmentadas o hiperpigmentadas.

Estadio III. Úlceras activas o en proceso de curación.

La crítica a esta clasificación clínica se basaba fundamentalmente en la falta de especificidad del estadio I y de subclasificación del estadio II. Posteriormente se realizaron otras clasificaciones como la de Hach en 1979, la de Partsch en 1980, Sytchev en 1985 y de Miranda en 1993 (Eklöf, 2007).

En el año 1993, con motivo del 5th Annual Meeting of American Venous Forum se sugirió la necesidad de una clasificación consensuada de la IVC. Tras un año de trabajo se llegó a la clasificación que se utiliza hoy en día. La denominación de la misma, C.E.A.P. (clinical-etilogic-anatomic-pathophysiologic), se basa en los siguientes criterios de clasificación:

1. Manifestaciones clínicas
2. Factores etiológicos
3. Distribución anatómica del daño venoso
4. Base fisiopatológica.

Basándose en estos cuatro criterios la severidad de la IVC se determina por: 1) el número de segmentos anatómicos afectados, 2) el grado de severidad de los síntomas y 3) la discapacidad que le supone al paciente.

Los pacientes con IVC se clasifican en:

1. Clínico (C).

- C0** Sin signos ni síntomas evidentes de enfermedad venosa
- C1** Telangiectasias o venas reticulares
- C2** Varices colaterales o tronculares
- C3** Venas varicosas con edema
- C4** Varices con cambios cutáneos tróficos de éstasis venosa (dermatitis ocre, lipodermatoesclerosis o eczema entre otros)
- C5** Venas varicosas con úlcera cerrada
- C6** Venas varicosas con úlcera abierta

2. Etiológico (E).

- Ec** Congénita
- Ep** Primaria
- Es** Secundaria a etiología conocida (postraumática o postflebítica)

3. Anatómica (A)

- As** Vena del sistema venoso superficial
- Ad** Vena del sistema venoso profundo
- Ap** Vena del sistema venoso perforante

4. Fisiopatológica (P)

- Pr** Reflujo
- Po** Obstrucción

4. Epidemiología y etiología.

Aunque los estudios epidemiológicos realizados en diferentes regiones del mundo han evidenciado enormes variaciones en la prevalencia de la insuficiencia venosa (Robertson et al., 2008), su incidencia es cada día más frecuente (Carpentier et al., 2004, Robertson et al., 2008). En España, la IVC es una dolencia con una elevada prevalencia, afectando a más de 6 millones de personas (Lozano et al., 2001, Callejas and Manasanch, 2004).

En las venas varicosas el flujo está distorsionado, produciéndose estancamiento y reflujo sanguíneo. La causa y la secuencia de los eventos que conducen a tal ineficiencia en el flujo sanguíneo no están del todo claro. Se han propuesto diversos factores puede contribuir a la formación de varices, entre los que cabe destacar la historia familiar, la edad, el sexo y el embarazo (Laurikka et al., 2002, Robertson et al., 2008). Por ejemplo, la frecuencia de varices en pacientes con antecedentes familiares es 21.5 veces más elevado (Scott et al., 1995) y se incrementa con la edad, siendo de aproximadamente el 10% en personas menores de 30 años y del 55% en personas con edades comprendidas entre 55 y 64 años (Bradbury et al., 1999). También se ha constatado que las varices son más frecuentes en mujeres (Evans et al., 1999, Robertson et al., 2008, Laurikka et al., 2002), llegando incluso a ser hasta dos veces más que en varones (Criqui et al., 2003). El embarazo es otro factor que aumenta el riesgo de sufrir de varices, debido al incremento de la presión abdominal y a los cambios hormonales que induce, incrementándose el riesgo de padecer varices con el número de partos. Así, se ha comprobado que en mujeres con 1, 2, 3, 4 o más partos el riesgo se incrementa en un 32, 38, 43, 48 y 59%, respectivamente (Robertson et al., 2008). Junto a los factores mencionados anteriormente, otros como la obesidad, el tabaquismo, la hipertensión y la diabetes también inciden en la prevalencia de las varices (Robertson et al., 2008, Danielsson et al., 2002).

Aunque la incidencia de IVC aumenta con la edad, es de destacar que en su mayoría, esta dolencia la padecen personas de mediana edad que se encuentran en una etapa de actividad profesional, particularmente aquellas en las que su trabajo exige muchas horas de bipedestación, lo que contribuye en buena medida al absentismo laboral y tiene importantes repercusiones socio sanitarias y económicas.

Una de las hipótesis más aceptadas sobre la etiología de la IVC es la de la incompetencia valvular. Los estudios angiológicos demuestran que los pacientes con IVC presentan diversas alteraciones y daños de las válvulas tales como elongación, rigidez, rotura, adelgazamiento, retracción y adhesión (Van Cleef et al., 1992) e incluso la reducción de su número en el sistema venoso (Sales et al., 1998), así como hipotrofia y ensanchamiento del anillo valvular (Corcos et al., 1996b, Corcos et al., 1996a, Corcos et al., 2000). Estas modificaciones a menudo van acompañadas por una reducción en los niveles de colágeno valvular que finalmente se traducen en la pérdida de las propiedades visco-elásticas de las venas (Psaila and Melhuish, 1989).

Se ha considerado que la disfunción valvular representa un cambio patológico inicial en las venas varicosas causante del reflujo sanguíneo, que a su vez promueve el estancamiento sanguíneo y la hipertensión venosa. De hecho, la incompetencia de la válvula venosa parece ser crucial en el desarrollo de hipertensión venosa. La acumulación de sangre a su vez tiene repercusiones negativas sobre la pared venosa, debilitándola y dilatándola. La dilatación venosa puede también separar los pliegues endoteliales que forman la válvula y acentuar su incompetencia (Fowkes et al., 2001, Takase et al., 2004a). También hay que tener en cuenta la importancia de la disfunción valvular en la progresión y cronificación de la enfermedad. La incompetencia valvular primaria representa un proceso que se desarrolla simultáneamente en varios segmentos venosos discontinuos (Labropoulos et al., 1997), por lo que las válvulas distales pueden llegar a ser incompetentes de forma secundaria al reflujo y a la dilatación proximal, tendiendo a una progresión retrógrada de la

enfermedad (Meissner et al., 2007, Naoum and Hunter, 2007, Raffetto and Khalil, 2008a).

5. Procesos inflamatorios e infiltración celular.

Se ha demostrado que las válvulas de las venas safenas de paciente con IVC están infiltrados de monocitos y macrófagos. Esta infiltración es mayor en la cavidad de la válvula y en la pared venosa proximal que en la zona distal, lo cual sugiere que la presión venosa participa en el proceso de infiltrado (Takase et al., 2004b, Takase et al., 2004a).

Por otro lado, se sabe que la fuerza en cizalla o esfuerzo de corte (*shear stress*, fuerza por unidad de área ejercida por un fluido en movimiento en la dirección del plano tangente) baja o nula (producidos por el estancamiento sanguíneo) y/o el flujo turbulento sanguíneo (favorecido por la tortuosidad de la pared vascular y el cambio en la dirección del flujo sanguíneo) promueven procesos inflamatorios, el incremento de especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) y la migración de leucocitos (Traub and Berk, 1998, Berk et al., 2001, Hsiai et al., 2001, Passerini et al., 2003).

Mediante estudios inmunocitoquímicos y ultraestructurales se ha puesto de manifiesto que los leucocitos, bajo condiciones de presión, se acumulan en las extremidades inferiores, debido a la capacidad de adherirse al endotelio y de migrar a través del mismo (Yong and Khwaja, 1990). Los niveles de presión que soportan las extremidades inferiores en condiciones de bipedestación favorecen la activación de los leucocitos (Raffetto and Khalil, 2008b). Los leucocitos activados expresan diferentes moléculas de adhesión tales como L-selectina, que es secretadas al plasma, y la integrina CD11b que se liga firmemente a la molécula de adhesión intracelular-1 (*Intercelular Adhesion Molecule-1*; ICAM-1) por lo que pueden adherirse al endotelio y posteriormente migrar a través de él (Yong and Khwaja, 1990).

Se ha observado que la hipertensión venosa inducida por 30 minutos de bipedestación en pacientes con IVC produce varias alteraciones relacionadas con moléculas de adhesión en el plasma (Saharay et al., 1998). Se produce la reducción de los niveles de L-selectina e integrinas en los neutrófilos y los monocitos circulantes como consecuencia de su retención en la pared venosa durante la microcirculación; al tiempo que se incrementan los niveles plasmáticos de L-selectina, lo cual refleja la liberación de estas moléculas durante la adhesión de los leucocitos a las células endoteliales. Incluso, en pacientes con IVC, estas moléculas de adhesión se producen por el simple hecho de caminar, presumiblemente en respuesta al incremento de la presión hidrodinámica que se transmite a través de las venas perforantes incompetentes y los vasos cutáneos y subcutáneos (Ciuffetti et al., 1999).

Los leucocitos activados son capaces de producir importantes cantidades de ROS, como el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y proteasas que degradan la matriz extracelular (*Extracellular Matrix*, ECM) (Michiels et al., 2002). Asimismo pueden liberar distintos factores de crecimiento, como el bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*) y el PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) que pueden inducir la proliferación, la migración y la desdiferenciación de las células musculares lisas, lo que contribuye al remodelado de la pared venosa (Michiels et al., 2002, Naoum et al., 2007).

Por otro lado, las células endoteliales cumplen un papel importante en la regulación de la inflamación, del remodelado y del tono vascular en insuficiencia venosa. Estas células suelen estar deformadas (Aunapuu and Arend, 2005) y activadas (Michiels et al., 2002) y son capaces de liberar distintos tipos de mediadores inflamatorios como moléculas de adhesión, factor de von Willebrand, factores de crecimiento (Aunapuu and Arend, 2005) y sustancias vasoactivas. En la Figura 2 se esquematizan los procesos inflamatorios asociados a la patología de la IVC.

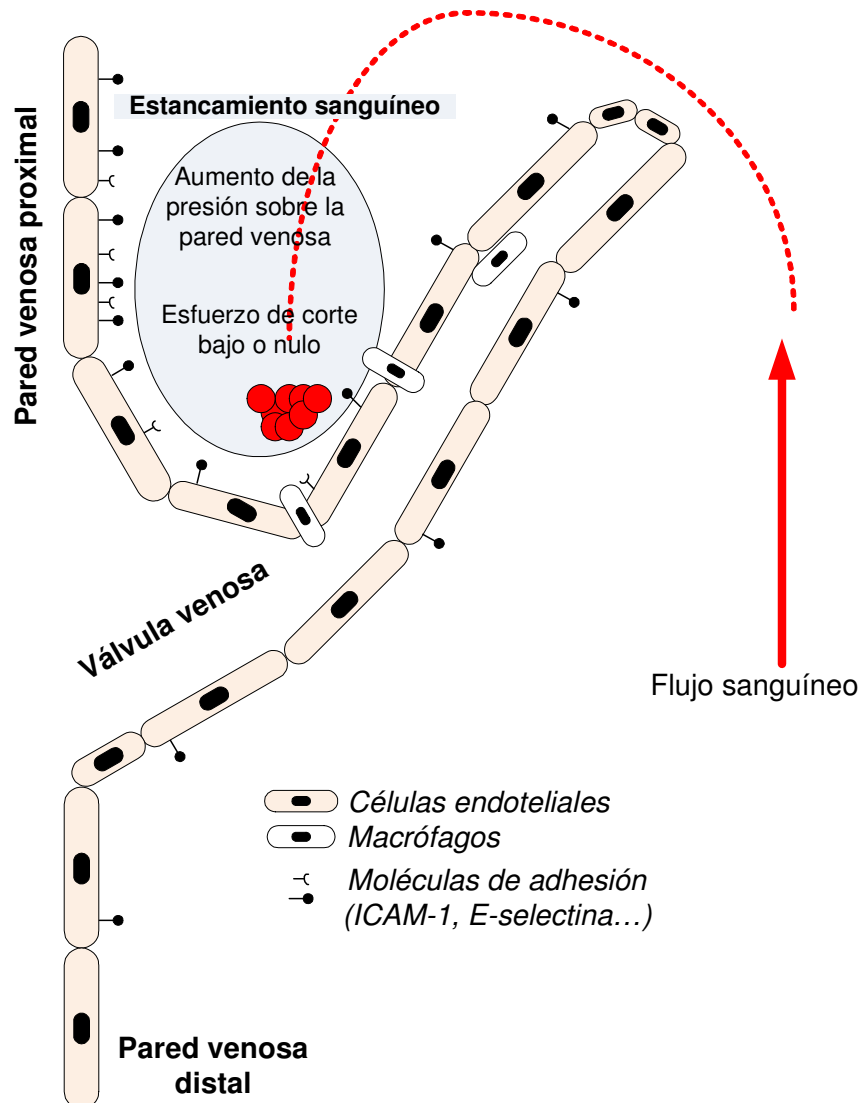


Figura 2. Procesos inflamatorios en una válvula con insuficiencia venosa (Adaptado de (Bergan, 2007)).

6. Cambios primarios en la pared de venas varicosas.

Aunque la génesis de la patología varicosa puede estar relacionada con la disfunción valvular primaria, algunos datos de dilatación venosa y reflujo, obtenidos mediante ultrasonografía, indican que los cambios en la pared venosa pueden constituir el evento primario que causa las varices. Se han observado numerosos cambios en los componentes celulares y en la ECM de todas las capas de la pared de las venas varicosas (Naoum et al., 2007), por lo que otra hipótesis que se baraja es que la formación de las venas varicosas

sea una consecuencia de defectos primarios de la pared, que causa el debilitamiento y la alteración del tono venoso (Raffetto and Khalil, 2008b, Somers and Knaapen, 2006). Los estudios más recientes sobre la patogénesis de las varices están focalizados en los cambios bioquímicos y estructurales que ocurren en la pared venosa (Raffetto and Khalil, 2008b).

Se ha prestado especial atención al estudio de las alteraciones de la ECM ya que ésta juega un papel relevante en la mecánica vascular y sus anomalías. La ECM mantiene la integridad y homeostasis de la vena a través de sus interacciones con el endotelio y las células musculares lisas (Hobeika et al., 2007), por lo que no es de extrañar que su degradación pueda contribuir al debilitamiento y a la dilatación de la pared venosa. Entre otras anomalías se ha observado que las venas varicosas presentan fibras elásticas fragmentadas y fibras individuales de colágeno engrosadas (Wali and Eid, 2002, Porto et al., 2002). Estos cambios afectan el balance entre el contenido de elastina y colágeno que puede contribuir al debilitamiento de la pared venosa (Wali et al., 2003). Asimismo, la expresión de varios genes asociados con la regulación de la homeostasis de la pared venosa, está alterada en varices, entre otros aquellos involucrados en la síntesis de ECM, tubulinas, actinas, colágeno tipo I, versican, actina y tropomiosina (Lee et al., 2005).

La homeostasis de la ECM está regulada por un grupo de enzimas conocidos como metaloproteinasas de matriz (*Matrix Metalloproteinasas*, MMPs) y por sus inhibidores endógenos (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinasas*, TIMPs). Las MMPs son endopeptidasas, dependientes de zinc de la familia de las proteasas conocidas como metzincinas, capaces de degradar muchos de los constituyentes de la ECM. Las MMPs son reguladas a nivel de transcripción y traslación, y pueden ser activadas o inhibidas por proteínas plasmáticas tales como α_2 -macroglobulinas y TIMPs. Se han identificado 23 MMPs en humanos, de los cuales al menos 14 se expresan en tejido vascular.

Se han descrito diversas alteraciones de MMPs y TIMPs asociadas a la patología venosa, las cuales se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Expresión y/o actividad de MMPs y de TIMPs en muestras de pacientes con y sin varices.

Referencia	muestras	Varicosas <i>versus</i> no varicosas
(Sansilvestri-Morel et al., 2007)	VS	↑ MMP-1, MMP-2, MMP3, MMP-7, TIMP-1 y TIMP-3 ↓ TIMP-2
(Sansilvestri-Morel et al., 2005)	CML	↑ MMP-3
(Kowalewski et al., 2004)	VS	↑ MMP-2 y MMP-3
(Woodside et al., 2003)	VS	↓ actividad de MMP-9
(Jacob et al., 2002)	Sangre	↑ MMP-9

MMP, metaloproteinasas de matriz; TIMP, inhibidores de metaloproteinasas; VS, vena safena; CML, células musculares lisas.

Las causas de las alteraciones que presenta la ECM aún no están esclarecidas, se ha propuesto que pueden existir causas primarias o secundarias relacionadas con los diversos estresores a los que está sometida la pared de las venas varicosas. Por ejemplo, aquellos relacionados con el estancamiento de la sangre y la hipertensión venosa, que producen hipoxia, estiramiento mecánico, baja fuerza en cizalla, daño endotelial y la activación de leucocitos (Michiels et al., 2002, Naoum et al., 2007, Lim et al., 2010). El sistema venoso de la pierna está sujeto a grandes cambios de presión relacionados con la postura. Por ejemplo, en situaciones de bipedestación la presión en los tobillos generada por la columna de sangre puede alcanzar valores de hasta 100 mmHg (Raffetto and Khalil, 2008b). La diferencia en la capacidad de adaptación entre unos individuos y otros puede depender de factores genéticos y ambientales.

Como se desprende de lo anteriormente expuesto y resumido en la Figura 3, el funcionamiento normal del sistema venoso depende de la integridad de las válvulas, de la pared venosa y de la hemodinámica del flujo sanguíneo venoso. Estos tres componentes están interrelacionados y las venas varicosas presentan clínicamente alteraciones en todos ellos. Esto hace difícil establecer la secuencia de los eventos patológicos, lo que sumado a la etiología multifactorial de la enfermedad complica aún más el entendimiento del proceso de formación de las varices.

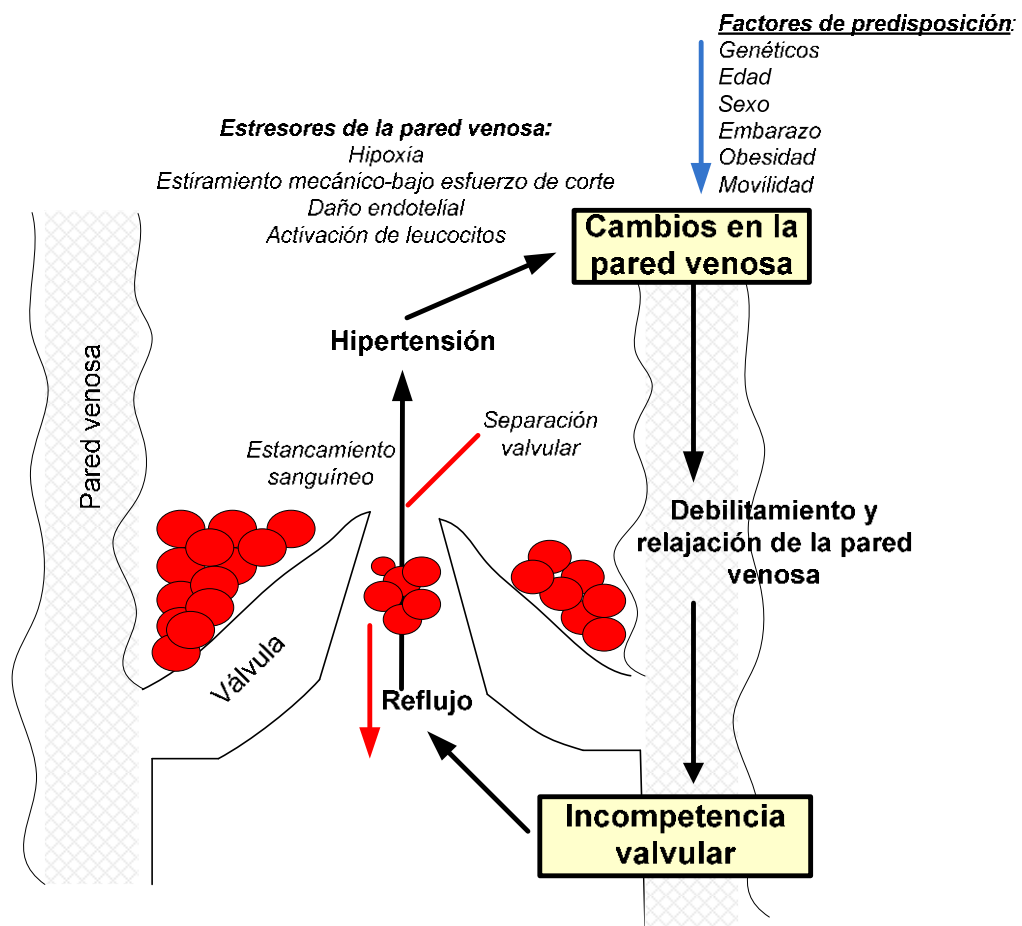


Figura 3. Esquema de los posibles mecanismos moleculares implicados en la formación de varices. (Adaptado de (Lim and Davies, 2009).

7. Tratamiento de la insuficiencia venosa crónica.

7.1. Cirugía. La cirugía es hoy en día uno de los tratamientos estándar de la insuficiencia venosa, el 30-50% de pacientes con IVC presentan una combinación de insuficiencia safena y de las venas perforantes (Darke and Penfold, 1992).

La cirugía venosa superficial puede producir efectos significativos en la hemodinámica venosa general, de hecho algunos segmentos venosos, tales como las venas perforantes y venas profundas, pueden invertir su incompetencia como consecuencia de la reducción en la sobrecarga venosa total de la pierna. Parámetros hemodinámicos tales como el volumen venoso y el índice de llenado venoso mejoran significativamente en pacientes con venas perforantes insuficientes inmediatamente después de la cirugía superficial y se mantiene en aquellos donde la incompetencia de las venas perforantes es revertida (Mendes et al., 2003). Se han propuesto dos mecanismos para explicar la corrección observada en las venas perforantes: 1) la eliminación del reflujo en la vena incompetente inducida por la ablación de las varices superficiales y 2) la reducción de la presión, por la eliminación del reflujo axial, que soporta la vena incompetente (Stuart et al., 1998).

El efecto beneficioso inducido por la cirugía venosa superficial depende del grado del avance de la insuficiencia venosa. Así, se ha descrito una incompetencia persistente en las venas perforantes y profundas después de la cirugía venosa superficial en situaciones avanzadas de la enfermedad venosa, donde persisten diversos factores locales que dañan la pared venosa (Blomgren et al., 2005). En este caso, se recomienda como tratamiento óptimo la ligadura de las venas perforantes junto con la cirugía superficial, pero es una práctica poco difundida debido a los resultados contradictorios que suelen arrojar (Iafra et al., 2002).

Los estudios clínicos han permitido establecer que los cambios inducidos por la cirugía primaria en el reflujo de venas superficiales, perforantes y partes remanentes de VSI es un proceso dinámico. Así, en un número importante de pacientes con venas perforantes incompetentes, la cirugía primaria superficial revierte la anomalía a lo largo de 2 a 24 meses. Por tanto, no existe la necesidad de interrumpir el flujo a través de las venas perforantes, algunas veces recomendado para prevenir la recidiva varicosa (Stuart et al., 1998, Mendes et al., 2003, Rutherford et al., 2001). Se especula que el mecanismo, por el cual la cirugía venosa superficial ejerce un efecto beneficioso sobre las venas perforantes incompetentes guarda relación con el periodo de adaptación requerida por los elementos elásticos de la pared venosa una vez reducido el volumen sanguíneo venoso (Turton et al., 1999).

Sin embargo, este efecto beneficioso duradero de la cirugía venosa superficial puede ser parcialmente contrarrestado por la formación de nuevos vasos incompetentes producidos por el re-direccionamiento del flujo venoso después de la remoción de la VSI. Las venas con la pared debilitada que reciben más flujo sanguíneo pos-operatorio pueden llegar a dilatarse y transformarse en varicosas (Turton et al., 1999). De ahí que, la recurrencia (ver más adelante), cuya etiología se desconoce, no se puede prevenir totalmente por la mejora de las técnicas de cirugía (Blomgren et al., 2005).

7.2. Tratamiento farmacológico de la IVC. Entre los fármacos flebotónicos se encuentran los flavonoides y derivados de los extractos del castaño de indias. Diversos ensayos clínicos han demostrado que estas sustancias parecen mejorar los síntomas de la IVC (Martinez et al., 2005, Struckmann, 1999). Aunque su mecanismo de acción no está totalmente esclarecido se sabe que, incrementan el tono venoso, reducen la inflamación de la pared y reducen la permeabilidad capilar (Martinez et al., 2005). Se ha sugerido que los flavonoides pueden proteger la pared vascular de la hipoxia e inhibir la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio y los leucocitos

(MacKay, 2001, Nicolaides, 2003). Por otra parte, los extractos del castaño de indias, que contienen el compuesto triterpénico saponina, poseen propiedades antiinflamatorias y antioxidantes (MacKay, 2001). Otro compuesto que parece ser efectivo en la sintomatología de la IVC es el pycnogenol (Horpag Research, Ginebra, Suiza). Este compuesto, extraído de la corteza de una planta marítima, tiene propiedades antiinflamatorias al inhibir la expresión de la 5-lipoxigenasa y la ciclooxigenasa-2 y al reducir la actividad de la fosfolipasa A2 (Canali et al., 2009).

El mecanismo de acción de estos y otros compuestos similares parece estar relacionado con su capacidad de reducir la inflamación de la pared venosa y el remodelado que sigue a la hipoxia, el estrés mecánico y la reducción del estrés de corte (Lim and Davies, 2009).

Otro grupo de compuestos potencialmente interesantes son los que restauran la homeostasis de la ECM, por ejemplo los moduladores de MMPs y TIMPs. Los inhibidores de las MMPs, como las estatinas o la doxiciclina, han demostrado reducir la degradación de la pared arterial en aneurismas (Abdul-Hussien et al., 2009), por lo que existe la posibilidad de que ejerzan un efecto similar en la pared de venas varicosas.

8. Recidiva varicosa

Se denomina *variz recidivante* a la presencia de varices en un territorio tratado previamente de una manera correcta y completa. *Variz residual* es la variz previa no tratada durante la intervención y *variz recurrente* es la vena sana que enferma tras la intervención por evolución de la enfermedad en un territorio diferente al que había sido tratado. En la práctica se considera la recidiva varicosa tanto a las recurrentes como a las residuales.

La recidiva varicosa es un problema común y costoso a pesar de las mejoras actuales en la evaluación pre-operativa y en las intervenciones

terapéuticas, y su prevalencia varía entre 20-80% (Badri and Bhattacharya, 2008).

8.1. Etiología de la recidiva varicosa. Las causas de recidiva varicosa más aceptadas en la actualidad son: una técnica quirúrgica incorrecta y la neovascularización.

Tradicionalmente, se pensó que la causa más común de recidiva era la inadecuada ligadura de la unión safeno-femoral y de la remoción (*stripping*) de la vena safena interna en la operación primaria (Bradbury et al., 1993). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que solo un tercio de las recidivas pueden ser evitadas mediante la completa remoción de la VSI (Joshi et al., 2011).

Otra posible causa de recidiva es la neovascularización, la cual se define como la formación de nuevos vasos en un tejido anormal que establecen múltiples conexiones tortuosas entre la unión safeno-femoral y la vena safena residual o sus tributarias (Glass, 1988). Sin embargo, técnicas de valoración empleadas tales como dúplex y flebografía (van Rij et al., 2003, Stonebridge et al., 1995), no son capaces de probar si los pequeños canales venosos observados en las venas varicosas están asociados con un proceso de neovascularización, o simplemente constituyen una expansión de las venas colaterales existentes en respuesta a los cambios en la fuerza hemodinámica inducidos por la cirugía primaria (El et al., 2004, Egan et al., 2006). Se ha propuesto la proteína S100 como marcador de la formación de venas *de novo*; sin embargo, su especificidad es controvertida (Nyamekye et al., 1998, El et al., 2004). Ello explicaría que en la mayoría de estudios la tasa de recidiva relacionada con la neovascularización es muy variable, incluso algunas veces inconsistente (Dwerryhouse et al., 1999).

Además de las causas anteriormente descritas, aproximadamente un 25% de los casos de recidiva no tienen un origen justificado y se considera que son consecuencia del avance de la propia enfermedad varicosa. En todo caso, la

presencia de recidiva supone un problema adicional al paciente, que debe someterse nuevamente a cirugía, con el riesgo que ello conlleva, por lo que la posibilidad de detectar precozmente el desarrollo de recidiva es de gran interés.

La recidiva varicosa es un problema común y costoso a pesar del desarrollo innovador actual en la evaluación pre-operativa y las intervenciones terapéuticas. Su prevalencia varía entre el 20 al 80%. Se calcula que el 20% del total de cirugías efectuadas por varices son por recidiva varicosa. En la cirugía convencional las tasas de recurrencia a 3 y 5 años son del 30-40%, que aumentan a los 10 años.

La tasa de recidiva varicosa a los 5 años es del 32% en método CHIVA, con peores resultados en el shunt tipo 3, donde el 25% desarrolla una colateral varicosa visible, que precisa una actuación (cirugía vs escleroterapia), en el resto de los tipos de shunt los resultados son muy buenos, con tasa de recidiva menores del 10% a tres años (Iborra et al., 2006). En el endolaser la tasa de recurrencia es comparable con la cirugía (Malý et al. 2010).

B. ESTRÉS OXIDATIVO

1. Definición

El estrés oxidativo tradicionalmente se define como una situación de desequilibrio global entre pro-oxidantes y antioxidantes existente en un sistema biológico, en favor de los primeros (Sies, 1985). Recientemente se ha redefinido el estrés oxidativo como una alteración de la señalización y el control redox (Jones, 2006) atendiendo a las nuevas evidencias científicas generadas tales como: 1) en condiciones fisiológicas normales los pro-oxidantes o especies reactivas actúan como moléculas de señalización, 2) la activación discreta de rutas sensibles al estado redox puede tener lugar de manera independiente al balance entre pro-oxidantes y antioxidantes y 3) altos niveles de pro-oxidantes no son selectivos en oxidación, es decir, el daño oxidativo no es exclusivo de las macromoléculas.

2. Radicales libres biológicos

Los radicales libres se definen como moléculas o fragmentos de moléculas que contienen uno o más electrones desapareados en orbitales atómicos o moleculares, lo que les confieren una alta reactividad (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Los radicales derivados de oxígeno (ROS) representan la clase más abundante en los sistemas biológicos (Miller et al., 1990). Otros radicales libres de importancia biológica son los radicales libres derivados del nitrógeno (*Reactive Nitrosative Species*, RNS). A continuación se describen los ROS y RNS más importantes de la pared vascular.

2.1. Radical anión superóxido. El oxígeno molecular tiene una configuración electrónica única y es por sí mismo un radical. La adición de un

electrón a la forma dioxigenada produce el radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el cual es considerado como un ROS primario, es decir a partir del cual se generan otros ROS, ya sea por interacción directa con otras moléculas o mediante procesos catalizados por metales o enzimas (Valko et al., 2005). La producción de $O_2^{\bullet-}$ tiene lugar fundamentalmente en las mitocondrias de la célula relacionado con el funcionamiento de la cadena respiratoria (Cadenas and Sies, 1998). Se estima que durante la transducción de la energía se produce la fuga de una pequeña cantidad de electrones, aproximadamente del 1-3%, que interaccionan con el oxígeno molecular y forman $O_2^{\bullet-}$.

2.2. El radical hidroxilo ($\bullet OH$). Es la forma neutra del ión hidróxido y posee una elevada reactividad, convirtiéndolo en un radical peligroso. Tiene una vida media muy corta 10^{-9} s *in vivo* (Pastor et al., 2000), de modo que suele reaccionar en el mismo sitio de formación. Parte del estado redox de una célula es regulado por el hierro y cobre que contiene, mantenido el estado redox dentro de estrictos límites fisiológicos. Bajo condiciones de estrés, un exceso de $O_2^{\bullet-}$ favorece la liberación de hierro de las moléculas que lo contienen y su posterior participación en la reacción de Fenton genera $\bullet OH$ ($Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + \bullet OH + OH^-$) (Valko et al., 2005). El $O_2^{\bullet-}$ puede también participar en la reacción de Haber-Weiss ($O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + \bullet OH + OH^-$), la cual combina una reacción de Fenton con la reducción de Fe^{+3} mediante el $O_2^{\bullet-}$ (Liochev and Fridovich, 2002). Aunque se sabe que la reacción de Fenton ocurre *in vitro*, no se ha esclarecido del todo su relevancia en condiciones fisiológicas, debido a que la cantidad de hierro libre catalítico es bajo y además suele estar ligado a quelantes proteicos (Kakhlon and Cabantchik, 2002).

2.3. Radical peroxilo ($ROO\bullet$). El radical hidroperoxilo ($HOO\bullet$), una forma protonada de $O_2^{\bullet-}$, es la forma más simple de radical peroxilo pero que debido al valor pK_a del $O_2^{\bullet-}$ solo se forma en un 0.3% en condiciones fisiológicas (De Grey, 2002). Sin embargo, se ha demostrado que $HOO\bullet$ inicia la peroxidación de ácidos grasos por rutas paralelas: una independiente y otra dependiente de

hidroperóxidos de ácidos grasos (LOOH) (Aikens and Dix, 1991), siendo esta última un mecanismo relevante de iniciación de peroxidación de lípidos *in vivo*.

2.4. Óxido nítrico (NO[•]). El NO[•] es una molécula pequeña que posee un electrón desapareado y que por tanto es un radical libre. El NO[•] es generado en muestras biológicas por diversas óxido nítrico sintetas (*Nitric Oxide Sintetases*, NOSs), las cuales metabolizan la arginina a citrulina con formación de NO[•] mediante una reacción de oxidación en la que participan cinco electrones. El NO[•] participa como molécula de señalización en muchos procesos biológicos tales como neurotransmisión, presión arterial, mecanismos de defensa, relajación del músculo liso y regulación inmune (Bergendi et al., 1999). El NO[•], en medio acuoso, tiene una vida media de pocos segundos, pero es estable a bajas concentraciones de oxígeno (vida media >15 s). Asimismo, dado su solubilidad en medio acuoso y lipídico difunde con facilidad a través de la membrana citoplasmática.

2.5. Anión peroxinitrito. La células del sistema inmune producen simultáneamente NO[•] y O₂^{•-} durante el proceso oxidativo inducido por la inflamación. Bajo estas condiciones, estos radicales pueden reaccionar entre sí a alta velocidad ($7.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) y producir anión peroxinitrito (NO[•] y O₂^{•-} → ONOO⁻), una molécula mucho más oxidante, un RNS, que puede producir daño en el ADN y la oxidación de lípidos (Carr et al., 2000), de modo que, la toxicidad del NO[•] está relacionada con su capacidad para reaccionar con O₂^{•-}.

A altas concentraciones, los ROS/RNS pueden ser importantes mediadores de daños de estructuras celulares, ácidos nucleicos, lípidos y proteínas. Se sabe que el [•]OH reacciona con todos los componentes de la molécula de ADN, dañando bases púricas y pirimidínicas y también la desoxirribosa (Halliwell and Gutteridge, 1999). Por otro lado, se conoce que la formación de ROS inducido por metales no solamente daña el ADN, sino también otros componentes celulares tales como los residuos de ácidos grasos poliinsaturados, los cuales son extremadamente sensibles a la oxidación. Una vez formados, los ROO[•]

son reconfigurados mediante ciclación para producir endoperóxidos y finalmente malondialdehído (MDA) como producto de oxidación de lípidos. Sin embargo, el aldehído principal de la oxidación de lípidos es el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE). Ambos productos suelen ser tóxicos y mutagénicos.

Los residuos aminoácidos de las cadenas laterales de las proteínas son también susceptibles a la oxidación por ROS/RNS. La oxidación de residuos de cisteína podría derivar en la formación de disulfuros entre grupos tioles de proteínas (-SH) y tioles de bajo peso molecular, en particular glutatión (GSH). La concentración de grupos carbonilos, generado por diferentes mecanismos es una buena medida de la oxidación de proteínas mediada por ROS. Los productos avanzados de glicación (Advanced Glycated End products, AGEs) son una clase de productos complejos, que resultan de la reacción de carbohidratos y grupos amino libres de las proteínas.

El daño sobre las macromoléculas constituye la base sobre la que descansa la clásica definición de estrés oxidativo y la implicación de estos en algunas enfermedades.

3. Sistemas enzimáticos productores de ROS / RNS.

Tradicionalmente se ha asumido que los macrófagos eran la fuente principal de ROS en la pared vascular. Sin embargo, aunque no hay duda de que estas células juegan un papel importante (Cathcart, 2004), está claramente establecido que todas las células de la pared vascular –endotelio, CML y células de la adventicia- producen ROS en cantidades variables en respuesta a diversos estímulos (Griendling et al., 2000).

Los sistemas enzimáticos principales que generan anión superóxido y sus derivados en la pared vascular son la NADPH oxidasa, la xantina oxidasa, la NOS, la mieloperoxidasa. Asimismo, otros sistemas enzimáticos como la ciclooxigenasa, la lipooxigenasa hemoxigenasa y el citocromo P-450 pueden generar ROS. Finalmente también puede producirse ROS por la cadena de

transporte electrónico mitocondrial y salida al citoplasma (Touyz, 2005). La importancia relativa de cada uno de estos sistemas va a depender del estado fisiológico o patológico de la pared vascular (Figura 4).

3.1. NADPH oxidasa. Uno de los principales generadores de radicales anión superóxido es el complejo NADH/NADPH oxidasa que se encuentra unido a la membrana de las células endoteliales, CML y fibroblastos (Touyz et al., 2002, Lassegue and Clempus, 2003). Este complejo cataliza la reducción del oxígeno molecular usando NADPH como donante de electrones y generando radical anión superóxido. Esta enzima es una proteína multimérica con varias subunidades. La subunidad catalítica que transfiere los electrones es la gp91phox, la Nox1 o la Nox4, la p22phox es una subunidad estabilizadora que une la subunidad catalítica a la membrana plasmática, y las p47phox, p67phox y rac1, son subunidades reguladoras. El patrón de expresión de las diversas subunidades varía según las distintas células de la pared vascular y según el calibre de los vasos. En las CML la Nox1, o la Nox4 es la subunidad catalítica de la enzima, a diferencia de la NADPH oxidasa de neutrófilos, en la que la subunidad catalítica es gp91phox (Hanna et al., 2004).

La NADPH oxidasa de células fagocíticas, que se activa sólo mediante estimulación, produce radical anión superóxido al espacio extracelular de forma de estallido respiratorio (Babior et al., 2002). A diferencia de este patrón de activación, las enzimas de la pared vascular están activadas de forma constitutiva, produciendo radical anión superóxido intracelularmente de forma lenta y sostenida, de manera que puede servir como molécula de señalización (Touyz et al., 2002, Touyz, 2005).

Aunque las NADPH oxidasas vasculares son enzimas constitutivas, se ha demostrado que varios factores humorales, como la Ang II, la ET-1 o el factor de necrosis tumoral (TNF- α) regulan su actividad.

3.2. Xantina oxidasa. Otra fuente de radical anión superóxido en la pared vascular es la xantina oxidoreductasa. Este enzima es ubicuo y existe en dos formas interconvertibles, pero con diferente función: la xantina deshidrogenada (XDH; EC 1.1.1.204) y la xantina oxidasa (XO; 1.1.3.22) (Harrison, 2002). Granger y colaboradores demostraron que esta enzima puede participar en la patogénesis de la isquemia-reperfusión (Harrison, 2002). Durante la isquemia se produce una elevación de calcio que genera xantina oxidasa a partir de la xantina deshidrogenasa, (que predomina en circunstancias normales in vivo). Simultáneamente se genera hipoxantina a partir de ATP. Durante la reperfusión la entrada de oxígeno permite la oxidación de la hipoxantina a xantina por la XO para formar radical anión superóxido y peróxido de hidrógeno (Cai and Harrison, 2000).

3.3. Mieloperoxidasa. La mieloperoxidasa (MPO) es una enzima que genera ácido hipocloroso (HClO) y otras moléculas derivadas a partir de peróxido de hidrógeno. Se almacena en neutrófilos y monocitos y recientes evidencias indican que es una de las responsables del daño a la pared vascular en aterosclerosis (Bonomini et al., 2008). También se ha descrito un incremento en el contenido de mieloperoxidasa en venas varicosas, sugiriendo que podría tener un papel en las primeras etapas de la formación de venas varicosas mediante la generación de radicales libres (Glowinski and Glowinski, 2002).

3.4. Sintasa de óxido nítrico. El NO se sintetiza a partir de la L-arginina por la enzima NOS presente en las células endoteliales, plaquetas, macrófagos, CML y neuronas (Moncada and Palmer, 1991). Se han descrito tres isoformas de la NOS (NOS I, II y III), también denominadas nNOS, iNOS y eNOS, respectivamente. La nNOS y la eNOS son NOS constitutivas y la iNOS es una enzima inducible que requiere el estímulo por lipopolisacáridos o por citoquinas, induciéndose su síntesis como un mecanismo de respuesta

citotóxico. Las tres isoformas son inhibidas, de manera competitiva, por análogos de la L-arginina, como la NG-nitro-L-arginina-metil ester (L-NAME) (Moncada and Palmer, 1991).

La eNOS es también una tercera fuente de ROS. Una deficiencia en el sustrato, L-arginina, o en alguno de los cofactores del enzima, como la BH₄, está asociada con un desacoplamiento de la vía, lo que produce una reducción de la cantidad de NO y un aumento de la presencia de radicales anión superóxido y peroxinitrito (Landmesser et al., 2003). Esto mismo es lo que podría pasar en la pared de las venas varicosas, ya que se ha encontrado una disminución en la expresión de las tres isoformas de NOS (Haviarova et al., 2011).

Además de los sistemas enzimáticos mencionados anteriormente, existen otros enzimas como la lipoxigenasa, ciclooxigenasa, citocromo P-450 monoxigenasa, entre otras, que pueden generar ROS en la pared vascular en ciertas circunstancias (Bonomini et al., 2008). Asimismo, en situaciones patológicas en las que se produce el desacoplamiento de la eNOS, las ROS procedentes de la cadena de transporte mitocondrial pueden salir al citoplasma (Bonomini et al., 2008).

4. Principales mecanismos de defensa antioxidante.

La exposición *in vivo* a radicales libres procedentes de distintas fuentes ha conducido al desarrollo de una serie de mecanismos de defensa, que se pueden clasificar en: 1) mecanismos preventivos; 2) mecanismos reparadores, 3) defensa física y 4) defensa antioxidante (Cadenas, 1997). De todos ellos se exponen a continuación los mecanismos de defensa antioxidante que incluye los sistema enzimáticos: superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa y los antioxidantes no enzimáticos de bajo peso molecular representados por el glutatión, el ácido ascórbico y el α -tocoferol, entre otros.

En la figura 4 se esquematizan las rutas *in vivo* de la síntesis y degradación de las principales ROS.

4.1. Sistemas de defensa antioxidante enzimáticos

4.1.1. Superóxido dismutasa (SOD). La superóxido dismutasa (SOD) constituye la primera defensa enzimática que presenta la célula para hacer frente a la producción de radical primario $O_2^{\bullet-}$. Esta enzima cataliza la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ con la consiguiente formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno (Figura 4, reacción 2, R_2).

Se han caracterizado tres isoenzimas en mamíferos que difieren tanto en su localización celular como en los cofactores metálicos de sus centros activos: Cu/Zn-SOD (SOD1); Mn-SOD (SOD2) (Fridovich, 1974, Fridovich, 1975, McCord and Fridovich, 1988), y la EcSOD (SOD3) (Nozik-Grayck et al., 2005).

SOD1 es la principal SOD intracelular, localizada en el citoplasma con una pequeña fracción en el espacio inter-membrana de la mitocondria (Crapo et al., 1992). Su actividad depende de la presencia de Zn y principalmente de Cu (Valentine et al., 1979). El mecanismo de *scavenger* de $O_2^{\bullet-}$ involucra la reducción y re-oxidación del Cu en el sitio activo de la enzima (McCord and Fridovich, 1969). Es sensible al cianuro, lo cual ayuda a distinguirla de la SOD2.

SOD2 es una enzima que contiene manganeso (Mn) localizada en la matriz mitocondrial (Weisiger and Fridovich, 1973). El Mn presente el sitio activo sirve para catalizar la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ de manera similar las SOD1 and SOD3. A diferencia de la SOD1, la SOD2 no es inhibida por H_2O_2 (Beyer and Fridovich, 1987) y su vida media en suero es de 5-6 h comparado con los 6-10 min de la SOD1 (Gorecki et al., 1991).

SOD3, es una SOD1 extracelular, fundamentalmente encontrada en el espacio vascular extracelular, en la superficie celular y una pequeña fracción en el plasma y fluidos extracelulares. Su distribución en los distintos tejidos varía entre especies, pero en general la SOD3 se expresa de manera altamente selectiva en vasos sanguíneos, pulmones, riñones, útero y en menor proporción en el corazón (Folz and Crapo, 1994, Marklund, 1984). En tejidos dañados y aterosclerosis, la SOD3 ha sido también encontrada en células inflamatorias (Fukai et al., 1998).

4.1.2. Catalasa. La catalasa es una hemo-enzima antioxidante complementaria de las SODs, debido a que cataliza la transformación de H_2O_2 celular a oxígeno y agua particularmente en situaciones de estrés oxidativo (Figura 4, reacción 3, R_3). Puede descomponer millones de moléculas de H_2O_2 en cada segundo ($\sim 10^7$ M/s) sin producir radicales libres (Young and Woodside, 2001) y su papel catabólico parece estar restringido al H_2O_2 exógeno (Johnson et al., 2010).

La cantidad, y por lo tanto su actividad, depende del tejido animal; así, la actividad de la catalasa es alta en el hígado y en eritrocitos, medianamente alta en el riñón y en el tejido adiposo, intermedio en el pulmón y páncreas, y muy baja en el corazón y el cerebro (Deisseroth and Dounce, 1970). En humanos, la catalasa no se encuentra en las células musculares lisas ni en células endoteliales (Goyal and Basak, 2010); aunque, recientemente se ha publicado que la catalasa, así como la EcSOD y la glutatión peroxidasa, pueden ser liberados al plasma por neutrófilos (Berzosa et al., 2011).

4.1.3. Glutatión peroxidasa. La glutatión peroxidasa (GPx) desempeña un papel fundamental en la defensa antioxidante protegiendo las membranas frente a la peroxidación lipídica (Groussard et al., 2003). Participa en la reducción del peróxido de hidrógeno y de los hidroperóxidos orgánicos a expensas del glutatión (GSH) (Figura 4, reacciones 4 y 5, R_4 y R_5).

Se han identificado 4 tipos de GPx: 1) la citosólica o clásica (cGPx) la primera selenoproteína identificada en mamíferos, 2) la de hidroperóxidos de fosfolípidos (PHGPx), 3) la plasmática (pGPx) y 4) la forma gastrointestinal (GI-GPx) (Brigelius-Flohe, 1999). La especificidad de las GPx frente a los hidroperóxidos varía de forma clara entre cada una de ellas. La cGPx solamente es capaz de reducir hidroperóxidos solubles, tales como H_2O_2 , y algunos hidroperóxidos orgánicos análogos a los producidos de ácidos grasos, por ejemplo el hidroperóxido de cumeno o hidroperóxidos t-butilo. Los PHGPx y pGPx son capaces de reducir hidroperóxidos de lípidos más complejos, en tanto que la GI-GPx tiene una especificidad similar a la cGPx. Otro aspecto importante a considerar, que todas las GPx utilizan glutatión como sustrato tiol.

La pGPx es capaz de utilizar tioredoxina y glutaredoxina en vez de GSH como agente reductor en condiciones fisiológicas (Wolin, 2011). La principal fuente de pGPx es el riñón y su papel fisiológico parece estar relacionado con hacer frente al estrés oxidativo y/o la regulación del tono extracelular de hidroperóxidos implicado en la biosíntesis de mediadores lipídicos catalizados por lipoxigenasas (Bjornstedt et al., 1994).

4.2. Sistemas de defensa antioxidantes no enzimáticos de bajo peso molecular

4.2.1. Glutatión. El glutatión (GSH) es abundante en el citosol (1-11 mM), núcleo (3-15 mM) y mitocondria (5-11 mM) y es el principal antioxidante en estos compartimentos. El GSH es sintetizado en el citosol por acción secuencial de la glutamato-cisteína ligasa y la glutatión sintetasa y posteriormente transportado a las mitocondrias a través de un mecanismo facilitado. El GSH sintetizado en el interior de las células puede también ser exportado, a velocidades altas, a través de la membrana plasmática hacia espacios extracelulares; así cantidades importantes son secretadas al plasma sanguíneo, pero su vida media está en el orden de segundos - minutos (Ballatori et al., 2009).

Los principales roles protectores del GSH contra el estrés oxidativo comprenden: 1) su participación como cofactor de varias enzimas de detoxificación, tales como GPx y glutatión transferasa (GST), 2) su participación en el transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática; 3) su acción *scavenger* de $\cdot\text{OH}$ y oxígeno *singlete*, detoxificando H_2O_2 y peróxidos de lípidos por acción catalítica de la GPx (Figura 4, R₅), iv) su capacidad para regenerar los más importantes antioxidantes, ácido ascórbico y vitamina E, a sus formas activas (Valko et al., 2007).

El glutatión oxidado es acumulado en el interior de las células y el ratio GSH/GSSG es una medida del estrés oxidativo de un organismo (Jones et al., 2000). Una elevada concentración de GSSG puede producir el daño oxidativo de muchas enzimas.

4.2.2. Ácido ascórbico. Como una sustancia reductora fisiológica y cofactor de enzimas, el L-ascorbato participa en numerosas reacciones enzimáticas (Padayatty and Levine, 2001), actúa como antioxidante celular (Asard, 2002) y hace posible reciclaje del α -tocoferol de la membrana plasmática que protege frente a la peroxidación de lípidos (Figura 4, R₆) (May et al., 1998).

Su presencia en fluidos biológicos como el plasma está regulada a través de mecanismos que incluyen canales aniónicos (Wilson, 2005), intercambio ascorbato–ascorbato, hemicanales (Ahmad and Evans, 2002), intercambio glutamato–ascorbato- (Grunewald, 1993), y exocitosis (von Zastrow et al., 1986). Teóricamente, el ascorbato liberado por las células debería permitir reemplazar el ascorbato extracelular que ha sido oxidado o degradado (Konya and Ferdinandy, 2006), manteniendo la homeostasis en los fluidos extracelulares. Se ha estimado que los eritrocitos de humanas tienen la capacidad de regenerar el ascorbato total sanguíneo cada 3 minutos (May et al., 1998). Sin embargo, su concentración fisiológica en tales fluidos sucede a expensas de otros reductores intracelulares (GSH, NADPH).

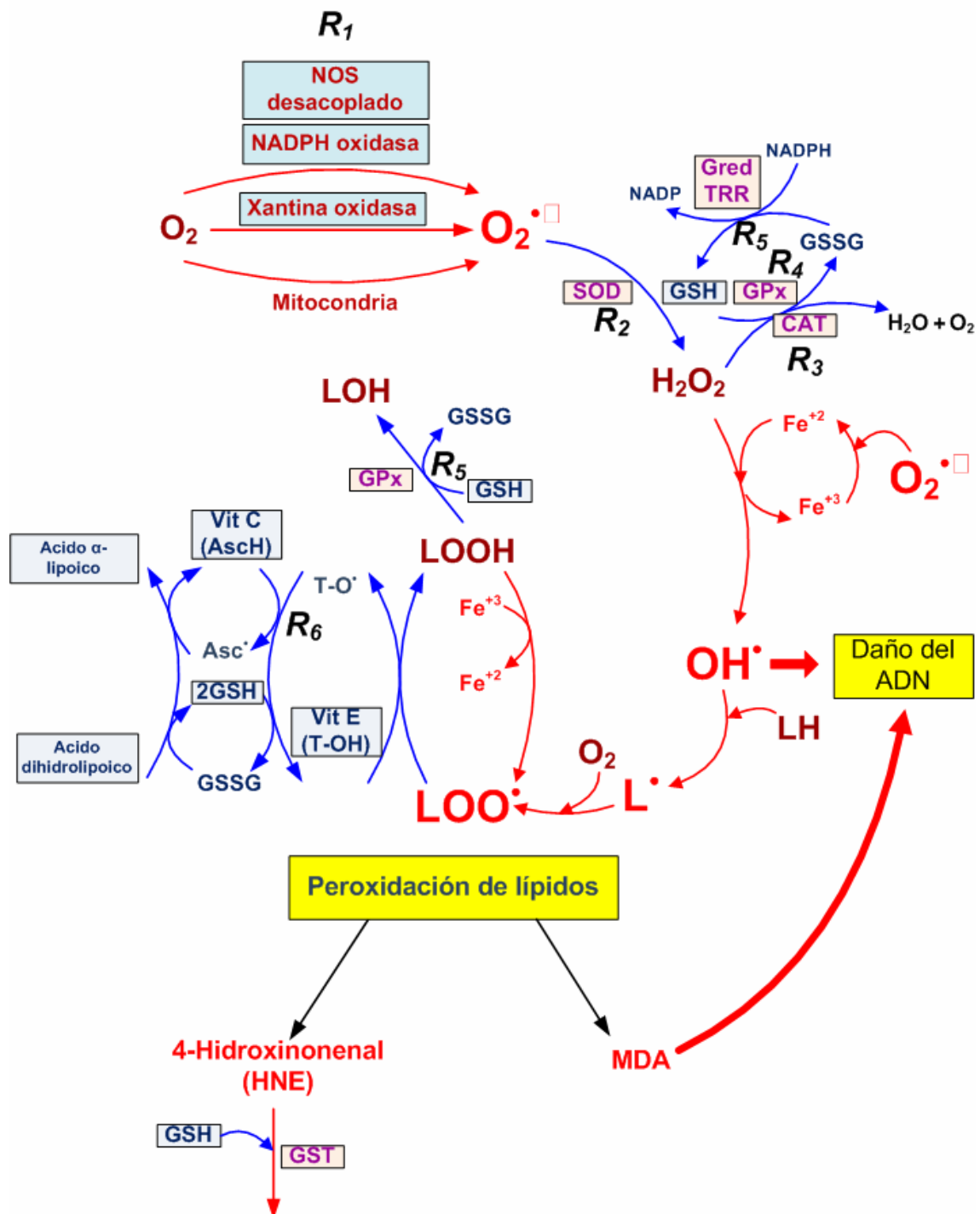


Figura 4. Reacciones de formación y eliminación de ROS mediante los principales sistemas de defensa antioxidante. Adaptado de (Valko et al., 2007).

C. BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN SITUACIONES PATOLÓGICAS

El estrés oxidativo ha sido implicado en varias condiciones patológicas tales como enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedades neurodegenerativas, diabetes, isquemia/reperfusión, así como en el proceso de envejecimiento (Dalle-Donne et al., 2006). Estas patologías pueden agruparse en varias categorías. El primer grupo comprende enfermedades caracterizadas por cambios en el estado redox tiol/disulfuro y la tolerancia a la glucosa promovida por ROS, conocido como “estrés oxidativo mitocondrial”. Entre otras cabe destacar el cáncer y la Diabetes Mellitus. El segundo grupo comprende enfermedades caracterizada por una condición “inflamatoria oxidativa” y el incremento de ROS inducido por NADPH oxidasa y xantina oxidasa.

El papel causal o propagador de los ROS/RNS en enfermedades humanas asociadas con el estrés oxidativo es un tema aún por resolver. Sin embargo, el hallazgo de estrés oxidativo en condiciones patológicas ha planteado el uso de biomarcadores de estrés oxidativo/nitrosativo en la implementación de nuevas estrategias de diagnóstico, prevención y terapéuticas para impedir o detener el desarrollo de complicaciones asociadas a las patologías.

La localización y efectos del estrés oxidativo, así como la información relacionada con la naturaleza de los ROS/RNS, pueden ser recabados del análisis discreto de daño/estrés oxidativo/nitrosativo aislados de tejidos y fluidos biológicos. Algunos ROS/RNS han sido directamente detectados *in vitro* por resonancia electrón spin; sin embargo estos métodos no son aplicables en estudios clínicos debido a la inestabilidad de las especies reactivas (corta vida media, segundos) y a la necesidad de equipos sofisticados y caros. Debido a que los productos de la reacción de los ROS/RNS con biomoléculas son más estables que los propios ROS/RNS, muchos de estos metabolitos estables y/o la concentración de productos target de oxidación han sido establecidos como biomarcadores oxidativos (Tabla 2).

Los biomarcadores pueden proporcionar información en tres niveles progresivos del desarrollo de la enfermedad:

1. Como medida final del daño a biomoléculas tales como lípidos y proteínas
2. Como marcador funcional
3. Como puntos finales relacionados a una enfermedad específica.

Aunque los síntomas clínicos de una enfermedad son puntos finales en sí mismos; sin embargo, como es obvio, no permiten la detección temprana y por tanto la prevención de enfermedades asociadas a estrés oxidativo. Los objetivos de un biomarcador son el de ayudar en el diagnóstico sintomático y pre-sintomático de la enfermedad y proporcionar puntos finales sustitutos para demostrar la eficiencia clínica de nuevos tratamientos.

Tabla 2. Biomarcadores de estrés oxidativo en diversas enfermedades humanas.

Enfermedad/biomarcador	
Cardiovascular	Aterosclerosis
<i>Hidroxinonenal</i>	<i>MDA</i>
<i>Ratio GSH/GSSG</i>	<i>Hidroxinonenal</i>
<i>Acroleína</i>	<i>Ratio GSH/GSSG</i>
<i>Peroxinitrito</i>	<i>Acroleína</i>
<i>F₂-isoprostano</i>	<i>Peroxinitrito</i>
Artritis reumatoide	Diabetes mellitus
<i>F₂-isoprostano</i>	<i>MDA</i>
<i>Ratio GSG/GSSG</i>	<i>Ratio GSH/GSSG</i>
	<i>Proteínas S-Glutationiladas</i>
Alzheimer	<i>Peroxinitrito</i>
<i>MDA</i>	<i>F₂-isoprostano</i>
<i>Hidroxinonenal</i>	<i>AGEs</i>
<i>Ratio GSG/GSSG</i>	
<i>F₂-isoprostano</i>	Isquemia/reperfusión
<i>Peroxinitrito</i>	<i>Ratio GSH/GSSG</i>
<i>AGEs</i>	<i>F₂-isoprostano</i>
Parkinson	Cáncer
<i>Hidroxinonenal</i>	<i>MDA</i>
<i>Ratio GSH/GSSG</i>	<i>Ratio GSH/GSSG</i>
<i>Proteínas carboniladas</i>	<i>Peroxinitrito</i>
	<i>8-desoxiguanosina</i>

Adaptado de (Valko et al., 2007).

Un biomarcador válido de estrés oxidativo/nitrosativo debería reunir las siguientes características:

1. Ser un producto estable, no susceptible de experimentar sesgos, oxidación, o pérdida durante el manejo, procesamiento, análisis y almacenamiento de la muestra.
2. Estar directamente implicado en el inicio y/o progresión de la enfermedad.
3. Estar accesible en el tejido diana o un sustituto válido que cuantitativamente refleje la modificación oxidativa del tejido en cuestión.
4. Estar presente en concentraciones suficientemente altas para representar un producto significativo.
5. Ser específico para las especies reactivas en cuestión y libre de sufrir modificaciones inducidas por la dieta.
6. Ser cuantificable por un ensayo específico, sensible, reproducible y no invasivo.
7. Ser fácil de detectar y medir en la población.
8. Estar presente en concentraciones que no varíen a lo largo del tiempo, de forma importante, en la misma persona bajo las mismas condiciones.

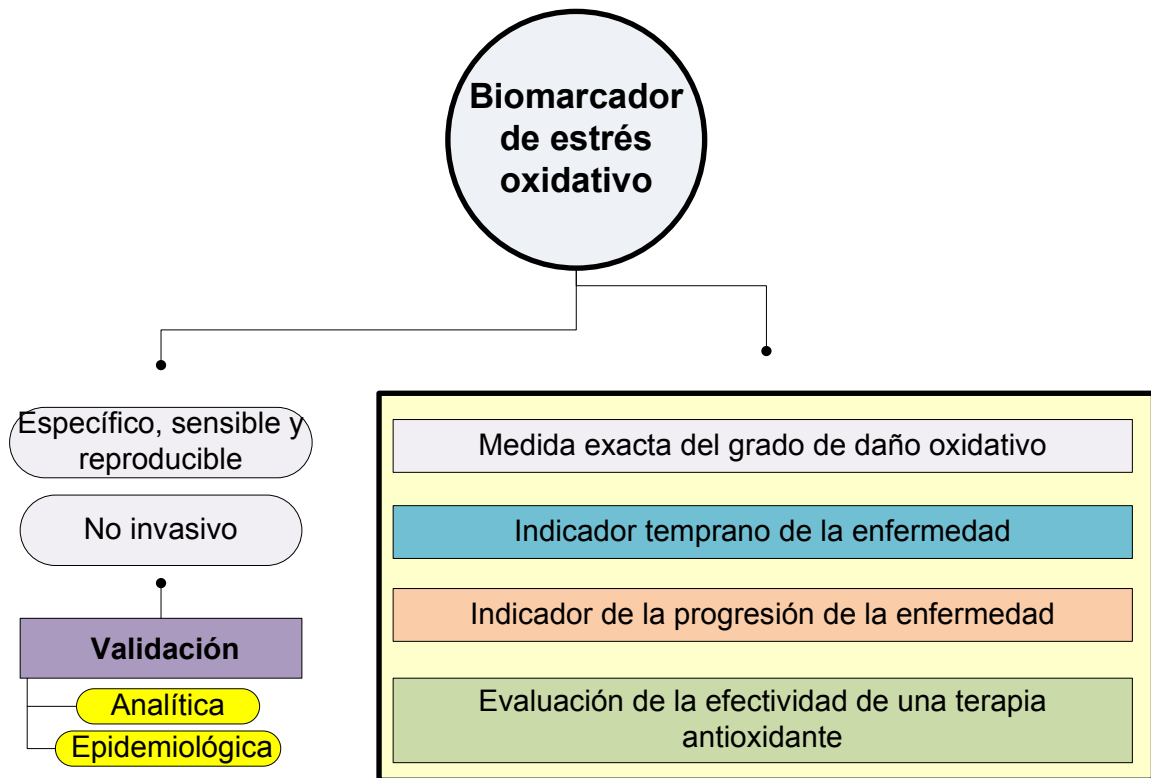


Figura 5. Criterios de elección y validación un biomarcador. Adaptado de (Dalle-Donne et al., 2006)

La validación de biomarcadores requiere de muchas etapas, que pueden ser agrupadas en: (a) la validación analítica, la cual incluye el desarrollo de procedimientos, análisis de material de referencia y control de calidad y (b) la validación epidemiológica, que menudo es difícil de lograr debido a la complejidad de las enfermedades asociadas con estrés oxidativo. De hecho, es altamente improbable que un simple biomarcador pueda sustituir una evidencia clínica.

Se han propuesto numerosos indicadores para medir el *status* prooxidante o antioxidante en diversas patologías, pero ningún de ellos puede ser considerado como estándar "*gold standard*" para medir el estrés oxidativo o cambios en el *status* oxidativo. Los estudios basados en la medida individual de estos indicadores arrojan resultados conflictivos, dado que sólo describen parcialmente el *status* oxidativo y suelen mostrar alta variabilidad intra- e inter-

sujetos (Veglia et al., 2006, Veglia et al., 2009a, Veglia et al., 2009b). Debido a ello, recientemente se ha propuesto el uso de un indicador integral que tiene en cuenta la naturaleza multifactorial del estrés oxidativo, y que se ha denominado OXY-SCORE. El OXY-SCORE se ha calculado tomando en cuenta medidas tanto del daño oxidativo y del sistema de defensa antioxidante (Veglia et al., 2010).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN.

La insuficiencia venosa crónica es una dolencia con una elevada prevalencia en la población española, afectando a más de 6 millones de personas. Existen numerosos condicionantes que pueden contribuir a la aparición de la IVC, entre los que cabe destacar la existencia de historia familiar previa, el género y el embarazo, así como el tipo de actividad laboral. De hecho, en su mayoría, la IVC la padecen personas de mediana edad particularmente aquellas en las que su trabajo exige muchas horas de bipedestación, lo que contribuye en buena medida al absentismo laboral.

En la actualidad no existe un tratamiento farmacológico efectivo para la IVC, siendo la única opción terapéutica la cirugía, con los riesgos que implica para el paciente y los costes que ocasiona al sistema sanitario. Por otra parte, la solución quirúrgica tampoco es totalmente satisfactoria para el paciente, ya que puede dejar secuelas o recidivas. Esto se debe a la falta de conocimiento preciso de los mecanismos que conducen a la enfermedad. Asimismo, tampoco existen en la actualidad pruebas clínicas específicas que permitan un diagnóstico precoz en los primeros estadios de la IVC, ni si el paciente va a presentar recidivas. El encontrar biomarcadores plasmáticos tempranos de la IVC podría servir para el diseño de tratamientos preventivos de la enfermedad en población de riesgo que podría evitar la cirugía.

OBJETIVOS.

El primer objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido la determinación de parámetros plasmáticos relacionados con el estrés oxidativo que estén alterados en la insuficiencia venosa crónica. Este objetivo general se subdivide en los siguientes objetivos parciales:

1. Determinación de las posibles diferencias en la capacidad antioxidante no enzimática total, medida mediante ORAC o TAC, entre el plasma de pacientes con varices primarias, recidivantes y sujetos control.

2. Determinación de las posibles diferencias en los niveles de glutatión reducido entre el plasma de pacientes con varices primarias, recidivantes y sujetos control.
3. Determinación de las posibles diferencias en los niveles de ácido úrico entre el plasma de pacientes con varices primarias, recidivantes y sujetos control.
4. Determinación de las posibles diferencias en la actividad catalasa plasmática entre pacientes con varices primarias, recidivantes y sujetos control.
5. Determinación de las posibles diferencias en los niveles de proteínas plasmáticas modificadas por MDA entre pacientes con varices primarias, recidivantes y sujetos control.
6. Determinación de las posibles diferencias en los niveles de proteínas plasmáticas carboniladas entre pacientes con varices primarias, recidivantes y sujetos control.
7. Determinación de las posibles diferencias en los niveles de productos avanzados de oxidación de proteínas plasmáticas entre pacientes con varices primarias, recidivantes y sujetos control.
8. Determinación de las posibles diferencias en los niveles de la actividad xantina oxidasa entre pacientes con varices primarias, recidivantes y sujetos control.
9. Determinación de las posibles diferencias en los niveles de la actividad mieloperoxidasa entre pacientes con varices primarias, recidivantes y sujetos control.
10. Determinación de las posibles diferencias en los niveles de las actividades de la MMP-2 y MMP-9 entre pacientes con varices primarias, recidivantes y sujetos control.

El segundo objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido diseñar y calcular un indicador global de estrés oxidativo (OXyVen) a partir de parámetros individuales de fácil cuantificación, adaptable al diagnóstico clínico y específico de estadíos iniciales de la patología venosa crónica y que pueda utilizarse para determinar la posibilidad de recidiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

A. MATERIALES

1. Reactivos

Casa comercial

Nº catálogo

Sigma Aldrich:

L-Glutatión reducido (GSH).....	G4251-300 MG
Acido metafosfórico (HPO ₃).....	23,927-5
Xantina.....	X7375-10G
Acido tiobarbitúrico.....	T5500-25G
Ioduro de potasio (KI)	30315
2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH).....	D19,930-3
Tris base.....	T1503-1 Kg
Glicina.....	G7126-1Kg
Cloramina T trihidratado.....	23270
1,1,3,3-tetraetoxipropano (MDA).....	T9889-25ML
Acido úrico (sal de sodio).....	U2875-5G
Acido 4-iodofenilborónico (4-IBPA).....	471933-5G
10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (<i>Amples Red</i>)	90101-5MG-F
Gelatina de piel de cerdo tipo A	G-25000-100G
2,2'-azo-bis-(2-metilpropianoamidina) dihidrocloruro (AAPH)	44,091-4
6-hidroxi-2,5,7-tetrametilcroman-2- acido carboxílico	23,881-3
Hidrocloruro de guanidina.....	G4505-25G
Dodecil sulfato de sodio (SDS).....	L3771-100G
Triton® X-100 para electroforesis.....	T8532-100ML
Peroxidasa Tipo I de rábano (HRP).....	P8125-25KU
N,N,N',N'-tetrametiletlen-diamino para electroforesis (TEMED).....	T9281-25ML
Dimetilsulfóxido.....	D5879-100ML
Albumina de suero de bovino.....	A7906-10G
Uricasa de <i>Candida</i> sp.....	U0880-250UN

Merck:

Cloruro de sodio (NaCl).....	536092
Cloruro de calcio dihidratado (CaCl ₂).....	TA523082
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄).....	A387573
Fosfato de potasio dibásico trihidratado (K ₂ HPO ₄)....	A543799
Hidróxido de sodio (NaOH).....	B553298
Hidróxido de potasio (KOH).....	K 236553583
Etanol.....	79760

Fluka:

O-Ftaldehído.....	09253
Luminol.....	03677
EDTA (sal disódica).....	46960
Fluoresceína de sodio.....	67684
Xantina oxidasa de suero de leche.....	310001964

Bio-Rad:

Marcadores de peso molecular (<i>Precision Plus Protein™, All blue standards</i>).....	161-0786
Biosafe™ Coomassie G-250 Stain.....	161-0146
Solución de Acrilamida/Bis al 40% (29:1).....	500-0006
Reactivo de Bradford (<i>Protein Assay</i>).....	161-0700
Persulfato de amonio.....	141076.1121

Panreac:

Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂).....	231019
Acido clorhídrico (HCl).....	211252.1611
Acido tricloroacético.....	74385
Nonidet P40.....	161318.1161
Acetato de etilo.....	219001

Calbiochem:

Catalasa de hígado de bovino 12660 U/mg

Probus:

Acido sulfúrico (H₂SO₄)

2. Equipos

- Eco Doppler color, marca Toshiba Xario, modelo SSA-660A (Toshiba Medical Systems Corporation).
- Centrifuga MEDIFRIGE (P Selecta).
- Lector de placas multidetección Sinergy™ HT (BioTek Instruments, Inc.).
- Lector de placas para medida de fluorescencia FluoroSkan Ascent Labsystem.
- Sistema de electroforesis Mini-PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad).
- Luminómetro de tubos Optocomp® I (MGM Instruments, Inc.).
- Bomba peristáltica EYELA Micro Tube MP-3 (Tokyo Rikakikai Co., LTD).
- Bomba de vacío (SCHOTT).
- Baño maría (Unitronic 320 OR). Incubador IG150 (Jouan).
- pH-metro XS pH 510 (EUTECH Instruments).
- Sistema de agua desionizada Ultra pure Water Milli-Q Plus (Millipore).

3. Sujetos de estudio

Se obtuvieron muestras de sangre venosa de un total de 84 pacientes con IVC y sujetos control, contando para ello con el consentimiento informado (ver Anexo 1).

El diagnóstico de varices primarias y recidivantes con indicación quirúrgica; así como, la ausencia de insuficiencia venosa, se confirmó mediante la anamnesis, el examen físico y la evaluación por eco doppler color. Los pacientes se clasificaron de acuerdo con el sistema CEAP.

Los sujetos se dividieron en tres grupos experimentales: 1) pacientes portadores de varices primarias, 2) pacientes con varices recidivantes y 3) sujetos control, los que no presentaron insuficiencia venosa. De estos, sólo se incluyeron en el estudio aquellos que cumplían con los criterios de inclusión presentados en la Tabla 3.

Tabla 3. Criterios de inclusión empleados para la selección de pacientes y sujetos control.

Menores de 60 años
IMC menor de 25 Kg/m ² de superficie corporal (sin sobrepeso)
Normotensos
Ausencia de diabetes
No fumadores
Sin dislipidemia
Sin otras patología asociadas al estrés oxidativo

El tiempo transcurrido entre la primera y segunda cirugía en los pacientes recidivantes fue en promedio 7 años y el rango varió entre 2 a 20 años.

La primera intervención quirúrgica se efectuó en el miembro inferior izquierdo a 6 pacientes (66,7 %), en el miembro inferior derecho a 1 paciente (11,1 %) y con afectación bilateral a 2 pacientes (22,2 %). En pacientes con varices recidivantes la segunda cirugía se efectuó: del miembro inferior izquierdo en 6 enfermos (75 %), del miembro inferior derecho en 1 pacientes (12.5 %), y de ambos miembros inferiores en 1 paciente (12.5%).

B. MÉTODOS

1. Diagnóstico clínico y eco *doppler*

Los sujetos incluidos en el estudio fueron interrogados con respecto a la sintomatología, los antecedentes médicos y/o quirúrgicos de insuficiencia venosa y otras patologías. Posteriormente se efectuó un examen físico vascular para catalogarlos según los criterios de diagnóstico clínicos, etiológicos, anatómicos y fisiológicos (C.E.A.P).

El eco *doppler* color se realizó según la sistemática del estudio. Este consistió en explorar a los pacientes en bipedestación. Se realizó una

cartografía de la anatomía venosa, así como la valoración hemodinámica de los sistemas venosos superficial y profundo.

2. Extracción de la sangre

La sangre de los sujetos objeto de estudio se extrajo mediante punción de una vena superficial del pliegue del codo, previa colocación de un torniquete en el brazo. Un volumen de 2. 4 mL de sangre se adicionó a tubos conteniendo 300 μ L de citrato (BD Vacutainer®, BD-Phymouth, PL6 7BP, UK) y se transportaron a 4°C al laboratorio para su procesamiento.

3. Preparación del plasma

Con el objeto de minimizar posibles cambios y/o degradación de las muestras se procesaron por centrifugación, a 900 g durante 10 minutos a 4°C, el mismo día de la extracción. En todos los casos, el tiempo transcurrido entre la extracción y el procesamiento fue inferior a las 4 h. El plasma obtenido se almacenó a -75°C en alícuotas de 50 μ L para su posterior uso.

4. Determinación de antioxidantes no enzimáticos

4.1. Glutatión reducido y oxidado

El nivel de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) plasmático se cuantificó empleando un micro-método espectro-fluorimétrico basado en la reacción específica entre el o-ftalaldehído (OPA) y el GSH/GSSG, que produce una intensa señal de fluorescencia (Hissin and Hilf, 1976, Zhenquan et al., 2010).

4.1.1. Protocolo experimental

El método original, con algunas modificaciones, se adaptó a un lector de placas. Un volumen de 10 μ L de plasma se mezcló con 12,5 μ L de HPO_3 (25%) y 37 μ L de tampón fosfato (100 mM, 5 mM EDTA, pH=8.0). Esta mezcla se incubó a 4°C durante 10 minutos para favorecer la precipitación de proteínas

plasmáticas. Seguidamente, el sobrenadante se separó mediante centrifugación a 2100 g x 20 minutos (4°C).

Para determinar el glutatión reducido (GSH), un volumen de 10 µL del sobrenadante, adecuadamente diluido, se hizo reaccionar con 10 µL de OPA (0.1% p/v en metanol) y 180 µL de tampón fosfato (100 mM, 5 mM EDTA, pH=8.0) a temperatura ambiente durante 15 minutos y en ausencia de luz en pocillos de una placa de 96. La fluorescencia se midió en un lector de placa Synergy™ HT con $\lambda_{\text{excitación}} = 360 \pm 40$ nm y $\lambda_{\text{emisión}} = 460 \pm 40$ nm y una sensibilidad de 75.

Para la cuantificación del glutatión oxidado (GSSG), un volumen de 10 µL del sobrenadante no diluido, se hizo reaccionar con 4 µL de NEM a temperatura ambiente durante 40 min para atrapar el GSH. Posteriormente 10 µL de la mezcla anterior se hizo reaccionar con 10 µL de OPA (0.1% p/v en metanol) y 180 µL de NaOH (0.1N) a temperatura ambiente durante 15 minutos y se prosiguió con el protocolo descrito para GSH.

4.1.2. Cálculos

El nivel de glutatión reducido y oxidado en las muestras se expresó en µg GSH o GSSG/mg de proteína, el cual se estimó a partir de la recta de calibrado del GSH preparado en el rango de 2-10 ng/µL (o de 4-20 ng/ ng/µL en el caso de GSSG) y del contenido de proteína del plasma medido según el micro-método de Bradford descrito en la sección 10.

4.2. Acido úrico

El nivel de ácido úrico plasmático se valoró mediante el método fluorimétrico ultra-sensitivo basado en el Amplex Red (AR). En este ensayo, la uricasa cataliza la conversión del ácido úrico a alantoina, H₂O₂ y CO₂. El H₂O₂, en presencia de peroxidada (Horse Radish Peroxidase, HRP) reacciona estequiométricamente con el AR para formar resorufina, un producto de

oxidación de AR (Figura 4). La resorufina puede ser medida por fluorescencia a $\lambda_{\text{excitación}}=571 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}}=588 \text{ nm}$.

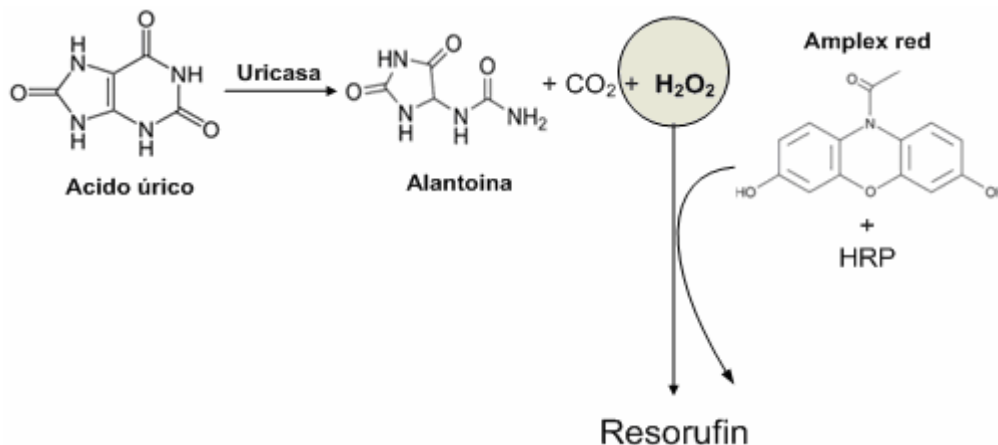


Figura 6. Método de cuantificación de ácido úrico mediante el método del Amplex Red.

4.2.1. Protocolo experimental

Un volumen de 50 μL de plasma y un volumen igual de reactivo de Amplex Red para medir ácido úrico (AR-AU, ver composición más adelante) se mezclaron en pocillos de una placa de 96 y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Seguidamente, se midió la señal de fluorescencia en un lector de placa Synergy™ HT ($\lambda_{\text{excitación}} = 530 \pm 25 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 590 \pm 35 \text{ nm}$), previa agitación de la placa a velocidad media durante 3 s.

Reactivo AR-UA:

- 50 μL del stock de Amplex Red (10 mM disuelto en dimetilsulfóxido)
- μL del stock de HRP (100 U/mL disuelto en agua)
- 20 μL de la solución stock de uricasa (100 U/mL disuelto en agua)
- 4910 μL de tampón Tris-HCl (100 mM, pH 7.5).

4.2.2. Cálculos

El contenido de ácido úrico plasmático se expresó en μM , el cual se estimó a partir de la recta de calibrado del ácido úrico obtenido en el rango de 0-30 μM .

5. Determinación de la capacidad antioxidante no enzimática total

5.1 Método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

La capacidad antioxidante no enzimática total del plasma se midió de acuerdo al protocolo fluorimétrico ORAC adaptado a un lector de placa (Condezo-Hoyos et al., 2009). Este método se fundamenta en la oxidación de la fluoresceína (sonda de fluorescencia) producida por radicales peroxilos ($\text{ROO}^\bullet$) los cuales son generados por descomposición térmica del 2,2'-Azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH). El antioxidante reacciona con los radicales peroxilos, retarda la oxidación de la fluoresceína y consecuentemente evita la pérdida de fluorescencia. El mecanismo en el que se fundamenta esta metodología experimental se muestra en la Figura 7.

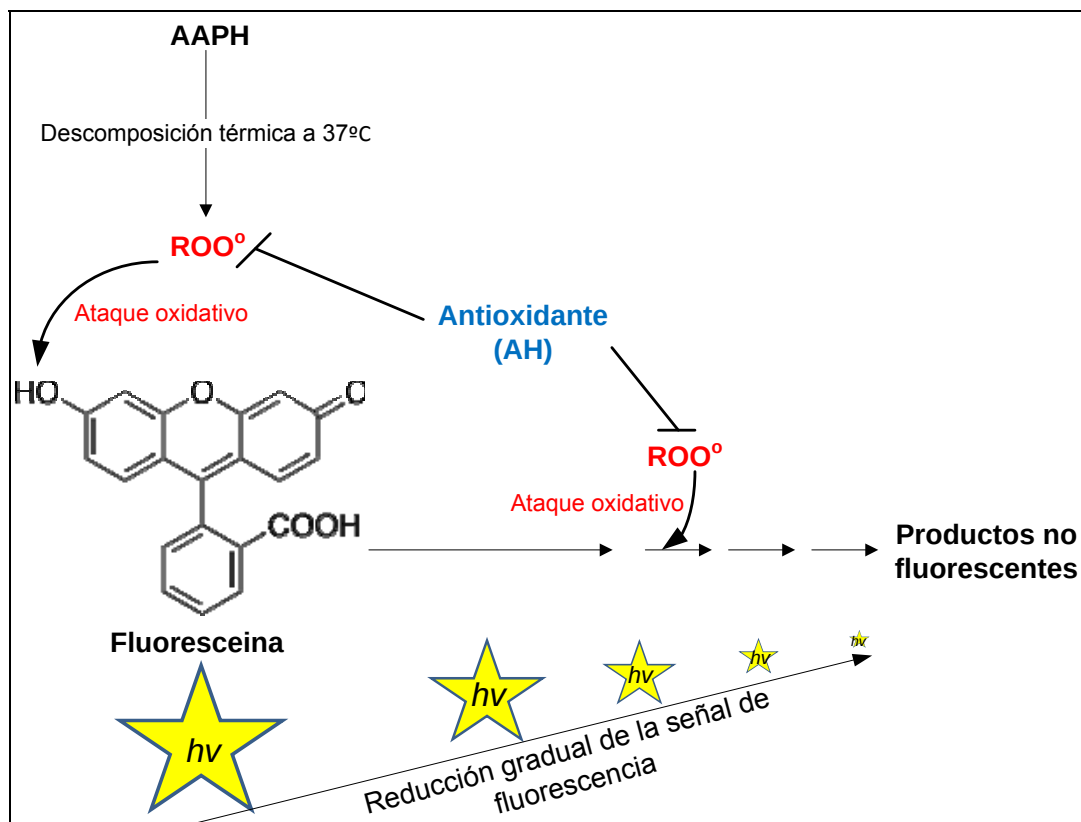


Figura 7. Mecanismo simplificado de oxidación de fluoresceína mediante $\text{ROO}^\bullet$ generado por descomposición térmica del AAPH que fundamenta el método ORAC. —| representa bloqueo y $\rightarrow$ representa activación.

5.1.1. Protocolo experimental

La reacción se llevó a cabo en tampón fosfato (75 mM, pH=7.4) y en una placa de 96 pocillos. Para ello, 20 μ L del plasma (diluido 400 veces) y 150 μ L de fluoresceína (100 nM) se adicionaron en los pocillos y a continuación se mezclaron por agitación a 1020 rpm durante 15 s. La mezcla anterior, se incubó a 37°C durante 10 minutos, e inmediatamente haciendo uso de una micropipeta multicanal se adicionaron 30 μ L de AAPH (80 mM). La nueva mezcla se agitó a 1020 rpm durante 30 s e inmediatamente se inició la adquisición de los valores de fluorescencia en un fluorímetro de placa Fluoroscanner Ascent con $\lambda_{\text{emisión}} = 538$ nm y $\lambda_{\text{excitación}} = 485$ nm durante 105 minutos a intervalos de 1.5 minutos. Antes de cada lectura de fluorescencia, la placa se agitó automáticamente a 1020 rpm durante 2 s para evitar la inclinación del *meniscus* en los pocillos que puede ocasionar la pérdida de exactitud en las mediciones.

5.1.2. Cálculo del valor ORAC

Los datos de cinética de fluorescencia se utilizaron para calcular el área bajo la curva (AC) tanto de las muestras, así como del trolox usado como antioxidante estándar. El valor de AC se calculó empleando la ecuación 1 incluida en las opciones del programa estadístico GraphPad Prism Versión 5 (GraphPad software, CA, USA).

$$AC = \left(0.5 + \sum_{i=1}^{i=60} \frac{f_i}{f_0} \right) \times 1.5 \quad (1)$$

Donde: f_0 es la fluorescencia inicial y f_i es la fluorescencia a diferentes tiempos.

El área neta bajo la curva (ACneta) de las muestras y del trolox (Figura 8) se calcularon restando a los valores de AC el correspondiente blanco de la reacción +AAPH (aquel que en lugar de la muestra o trolox, lleva tampón fosfato). En cada experimento se incluyó un control negativo -AAPH (que no contiene AAPH, en su lugar lleva tampón fosfato) a fin de demostrar que la

reducción de la fluorescencia se debe única y exclusivamente a la oxidación de la sonda de fluoresceína por radicales peroxilos. El valor ORAC se expreso en términos de equivalente de trolox por litro de plasma (ecuación 2) obtenido a partir de la recta de calibración de trolox preparado en el rango de 2-20 µM.

$$\text{Valor ORAC} = FD \times \frac{[AC_{\text{neta}}(\text{muestra})]}{[AC_{\text{neta}}(\text{trolox})]} \frac{[\text{molaridad del trolox}]}{[\text{litro de muestra}]} \quad (2)$$

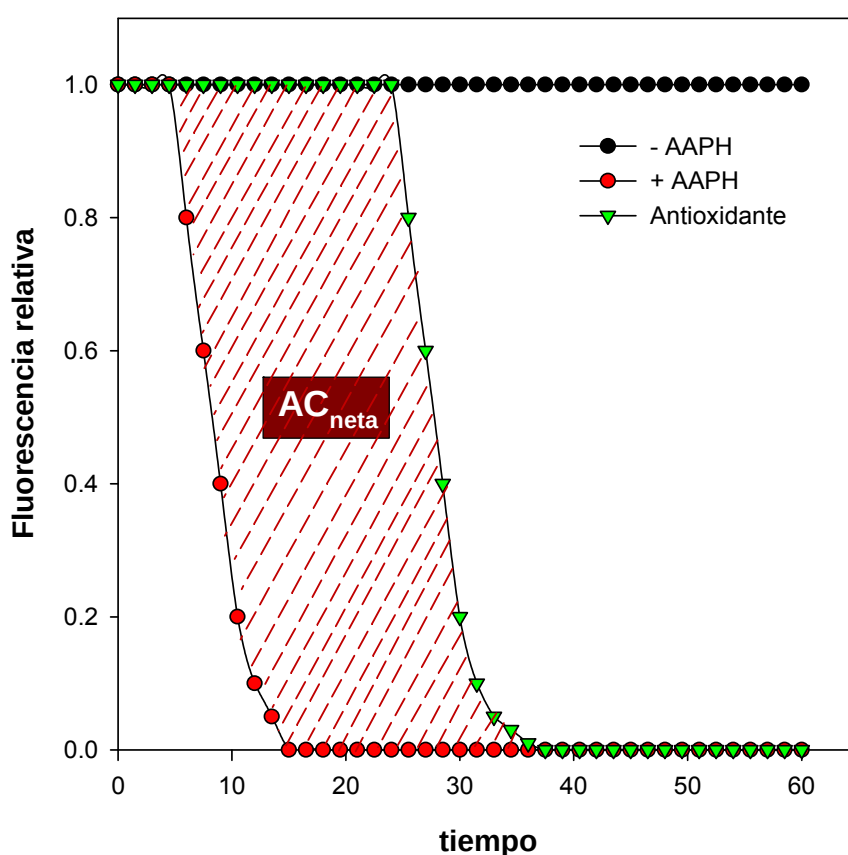


Figura 8. Área neta bajo la curva empleada en la determinación del valor ORAC.

5.2. Método TAC (Total Antioxidative Capacity) basado en la inhibición de la luminiscencia

La capacidad antioxidante del plasma adicionalmente se valoró mediante un ensayo de luminiscencia (Saleh and Plieth, 2010). Este método se

fundamenta en la inhibición de la reacción de luminiscencia del luminol catalizada por peroxidasa (HRP) en presencia de antioxidantes de bajo peso molecular presentes en el plasma (Figura 9). El ensayo TAC proporciona información sobre el potencial redox de los antioxidantes presentes en las muestras de biológicas.

5.2.1. Protocolo experimental

El protocolo TAC adaptado en nuestro laboratorio comprendió: 1) la adición de 50 μL de H_2O_2 (1.1 mM) a un volumen igual del reactivo HRP, 2) la medición de la señal de luminiscencia cada 5 s durante 2 minutos, a efectos de alcanzar la máxima señal, 3) la adición de 50 μL de plasma (diluido en un factor de 400 con el tampón TrisCaT) y 4) registro de la luminiscencia cada 5 s durante 500 s. La señal de luminiscencia se midió en un luminómetro individual de tubos OPTOCOMP I conectado a un ordenador. Los datos se adquirieron mediante el programa *Hyperterminal* de Microsoft.

La composición del reactivo HRP se modificó por inclusión de un “*enhancer*” diferente, el ácido 4-iodophenylborónico (4-IBPA). Asimismo, la concentración de algunas disoluciones “*stock*” se redujeron con el objeto de evitar problemas de insolubilidad. A continuación, se citan los reactivos utilizados en el ensayo TAC:

Tampón TrisCaT (1 M Tris base + 2 mM CaCl_2 y 1 mM Triton X-100) que se degasificó al vacío antes de la adición del Triton X-100 y se almacenó a 4°C hasta el momento de su uso.

Stock de luminol (0.25 M) disuelto en KOH 5 M, preparado el mismo día del experimento.

Stock de HRP (100 U/mL) disuelto en agua y almacenado a -20°C hasta el momento de su uso.

4-IBPA (25 mM) disuelto en etanol absoluto, preparado el mismo día del experimento.

H₂O₂ (1.1 mM) preparado a partir de al 30% p/v por dilución con tampón TrisCaT.

Reactivo HRP:

- 5 µL 4-IBPA (2.5 mM)
- 10 µL del stock de luminol (0.25 M)
- µL del stock de HRP (100 U/mL)
- 4975 µL de tampón TrisCaT

5.2.2. Cálculo del valor TAC

Los datos cinéticos de luminiscencia se transformaron a valores relativos haciendo uso de la ecuación 3 y a partir de ellos se estimaron los valores del AC mediante el programa estadístico GraphPad Prisma Versión 5. El valor TAC de las muestras de plasma se obtuvo por comparación con la recta de calibrado del antioxidante estándar (trolox) en el rango de 1-4 µM obtenida por análisis de regresión lineal del AC versus la concentración de trolox (ecuación 4).

$$\text{Luminiscencia relativa (LR)} = \left[1 - \frac{\text{luminiscencia}_{t_i}}{\text{luminiscencia}_{t=0}} \right] \quad (3)$$

$$\text{Valor TAC} = \frac{[(0.5 * \sum_{i=1}^n LR_i) * 10]}{\text{pendiente de la recta de calibrado}} \quad (4)$$

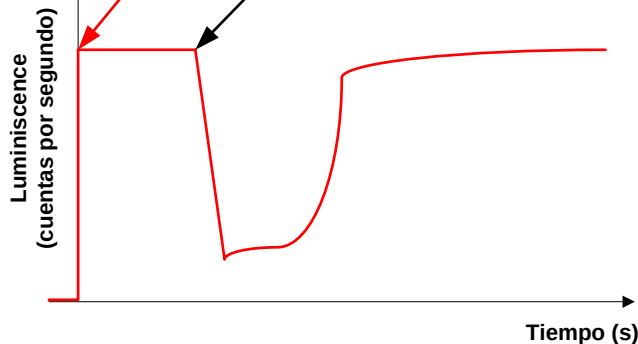


Figura 9. Mecanismo simplificado que fundamenta el método TAC de inhibición de la luminiscencia. AH es un compuesto aromático donador de hidrógeno, denominado “*enhancer*”, AO representa el/los antioxidante(s) de bajo peso molecular presente(s) en la muestra a analizar, AP es la aminoftalato, AQ es una diazaquinona, L es el luminol y SE es el estado conformacional de la HRP.

6. Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes

6.1. Catalasa

La actividad de la catalasa se cuantificó empleando el método fluorimétrico basado en la oxidación de la sonda Amplex Red producida por el H_2O_2 en presencia HRP. La catalasa es capaz de catalizar la descomposición del H_2O_2 en H_2O y por lo tanto reducir la señal de fluorescencia. Consecuentemente, a menor señal de resorufina, mayor es la actividad catalasa (Figura 10).

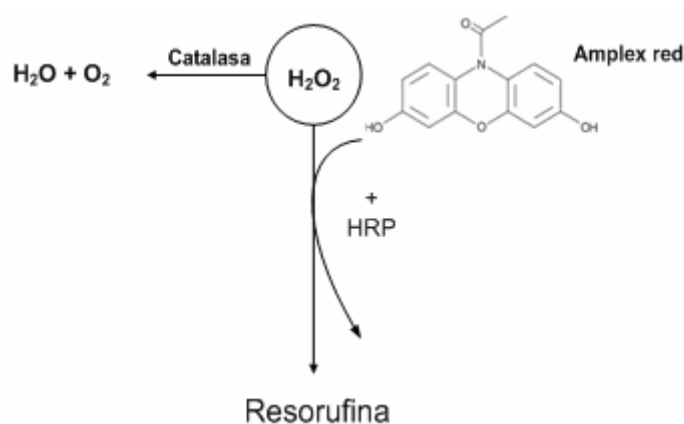


Figura 10. Mecanismo de oxidación del Amplex Red implicado en la cuantificación de la actividad catalasa.

6.1.1. Protocolo experimental

Se mezclaron 25 μL de plasma diluido (factor de dilución de 200 y 80 para las muestras control y varicosas, respectivamente) con un volumen igual de H_2O_2 y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, se adicionó 50 μL del reactivo Amplex Red para medir la actividad catalasa (AR-CAT) en cada uno de los pocillos, mediante una micropipeta multicanal. Inmediatamente después, la placa se incubó a 37°C por otros 30 minutos. Luego, previa agitación media durante 3 s en el lector de placa, se leyó la señal de fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}} = 530 \pm 25 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 590 \pm 35 \text{ nm}$) en un lector de placas multiusos Synergy™ HT.

Reactivo AR-CAT

- 50 µL del stock de Amplex red (10 mM disuelto en dimetilsulfóxido)
- µL del stock de HRP (100 U/mL disuelto en agua)
- 4930 µL de tampón Tris-HCl (100 mM, pH 7.5).

6.1.2. Cálculos

La actividad catalasa plasmática se expresó en U/mg proteína, la cual se estimó a partir de la recta de calibrado de la catalasa obtenido en el rango de 0-0.4 U/mL según el protocolo experimental descrito. La recta de calibrado se obtuvo por análisis de regresión lineal de los datos de fluorescencia residual obtenida según la ecuación 5 versus la concentración de catalasa en U/mL.

$$FL_{residual} = FL(blanco) - FL(catalasa) \quad (5)$$

Donde: FL (blanco) es la fluorescencia ($\lambda_{excitación} = 530 \pm 25$ nm y $\lambda_{emisión} = 590 \pm 35$ nm) de la muestra sin catalasa.

7. Determinación de la oxidación de proteínas**7.1. Carbonilos totales**

La cantidad de proteínas plasmáticas carboniladas se midió de acuerdo al método basado en la dinitrofenilhidrazina (DNPH) (Hawkins et al., 2009). 25 µL de plasma de los controles y de pacientes varicosos se mezclaron con DNPH (10 mM, disuelto en HCl 2.5 M). Seguidamente la mezcla se incubó a temperatura ambiente y en ausencia de luz durante 15 minutos. Cada 5 minutos los tubos se agitaron intensamente en un vortex para favorecer la reacción entre los grupos carbonilos plasmáticos y la DNPH. Las proteínas plasmáticas totales se precipitaron en ácido tricloroacético (10% p/v) frío durante 30 minutos. Mediante centrifugación a 2100 g x 30 min (4°C), se obtuvieron los pellets proteicos, los cuales se lavaron y centrifugaron, a las

mismas condiciones, dos veces con una mezcla fría de etanol/acetato de etilo (1:1 v/v) para eliminar el exceso de DNPH. A continuación los pellets se disolvieron en guanidina-HCl (6M), se transfirieron a una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 370 nm en un lector de placas Synergy™. La concentración de proteínas plasmáticas carboniladas se determinó mediante la ecuación 6.

$$\text{Proteínas plasmáticas carboniladas} \left(\frac{\text{nmol}}{\text{mg proteína}} \right) = \left(\frac{\epsilon_{\text{DNPH (370 nm)}}}{\text{mg proteína}} \right) \times 10^6 \quad (6)$$

Donde: $\epsilon_{\text{DNPH}} = 22\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, es el coeficiente de extinción del DNPH y $A_{370\text{ nm}}$ es la absorbancia a 370 nm.

7.2. Malondialdehído (MDA)

El contenido de proteínas modificadas por MDA se midió mediante el método del ácido tiobarbitúrico (TBA) (Esterbauer and Cheeseman, 1990). 20 μL de plasma se precipitaron con 60 μL de ácido tricloroacético (8% p/v) en frío durante 10 minutos. Seguidamente, se obtuvieron los pellets proteicos mediante centrifugación a 2100 g x 15 minutos (4°C) y lavado con 140 μL de ácido tricloroacético (6% p/v). Los pellets se incubaron a 60°C durante 90 minutos en presencia de H_2SO_4 (1% v/v) y TBA (0.67% p/v) para facilitar simultáneamente la liberación del MDA de las proteínas plasmáticas y su reacción con el TBA. Transcurrido este periodo, las muestras se enfriaron inmediatamente en hielo, se centrifugaron a 2100 g x 15 minutos (4°C) y la absorbancia del sobrenadante obtenido se midió a 530 nm en un lector de placa Synergy™ HT. El contenido de proteínas modificadas por MDA se calculó a partir de una recta de calibrado construida en el rango de 0-0.06 nmol MDA.

7.3. Productos avanzados de oxidación (Advanced Oxidation Protein Products, AOPP)

La concentración de AOPP se midió de acuerdo al método espectroscópico basado en la oxidación en medio ácido de iones de yoduro producido por los AOPP plasmáticos (Witko-Sarsat et al., 1996). El método original se adaptó a un lector de placa para hacerlo semi-automático. 50 μ L de plasma sin diluir, KI (151.3 mM) y ácido acético (25% v/v), se pipetearon en una placa de 96 pocillos y se mezclaron en un agitador orbital durante 2 minutos a temperatura ambiente. Después de 5 minutos de reacción, se leyó la absorbancia a 340 nm en un lector de placas Synergy™ HT. Los niveles de AOPP plasmáticos se expresaron en μ M equivalentes de cloramina-T /mg proteína, calculados a partir de la recta de calibrado de cloramina-T construida en el rango de 0-300 μ M.

8. Determinación de enzimas productoras de radicales libres

8.1. Xantina oxidasa

La actividad xantina oxidasa (XO) plasmática se midió mediante el sistema Amplex Red xantina/xantina oxidasa. 50 μ L del plasma diluido (factor de dilución 2.5) se mezcló con un volumen igual de reactivo par medir XO (AR-XO) en una placa de 96 pocillos y se incubó a 37°C durante 30 minutos. A continuación, previa agitación media durante 3 s, se midió la fluorescencia en un lector de placa Synergy™ HT usando $\lambda_{\text{excitación}} = 530 \pm 25$ nm y $\lambda_{\text{emisión}} = 590 \pm 35$ nm.

Reactivo AR-XO

- 50 μ L del stock de Amplex red (10 mM disuelto en dimetilsulfóxido)
- μ L del stock de HRP (100 U/mL disuelto en agua)
- 50 μ L de xantina (20 mM)
- 4880 μ L de tampón Tris-HCl (100 mM, pH 7.5).

La actividad xantina oxidasa plasmática se expresó en mU/mg de proteína, obtenida de una recta de calibrado de xantina construida en el rango de 0-1.0 mU/ml.

8.2. Mieloperoxidasa

La actividad mieloperoxidasa (MPO) de las muestras de plasma se valoró mediante la sonda de fluorescencia Amplex Red. 50 μ L de plasma diluido a la mitad con tampón fosfato salino (10 mM, pH=7.4) se pipeteó en una placa de 96 pocillos. A continuación se adicionó a cada muestra un volumen igual de reactivo de Amplex Red para medir MPO (AR-MPO), se mezcló y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos en ausencia de luz. Luego, la fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}} = 530 \pm 25$ nm y $\lambda_{\text{emisión}} = 590 \pm 35$ nm) se midió en un lector de placas Synergy™ HT.

Reactivo AR-MPO

- 40 μ L del stock de Amplex red (10 mM disuelto en dimetilsulfóxido)
- 8 μ L de H₂O₂ (5 mM)
- 1952 μ L de tampón fosfato salino (10 mM, pH 7.4).

La actividad mieloperoxidasa plasmática se expresó en mU/mg proteína, obtenida de una recta de calibrado típica reportada en la web de Invitrogen (<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Molecular-Probes/Key-Molecular-Probes-Products/Amplex-Red-Enzyme-Assays.html>).

9. Actividad de metaloproteinasas MMP-2 y MMP- 9

Las actividades de las MMP-2 y MMP-9 se midieron mediante zimografía en geles de gelatina (Hawkes et al., 2001, Iwai et al., 2008). Esta técnica comprende la separación electroforética de las proteínas plasmáticas en condiciones no desnaturalizantes y no reductoras, la re-naturalización de las proteínas por eliminación de SDS, la incubación del gel en un tampón adecuado para maximizar la actividad de las metaloproteinasas y finalmente la

detección de la actividad proteolítica usando el colorante Coomassie Blue (Hawkes et al., 2001).

9.1. Preparación de geles en gradiente

Los geles en gradiente conteniendo gelatina como sustrato gelatina tipo A se prepararon usando el sistema implementado mostrado en la Figura 11. Se prepararon dos disoluciones con 4% y 15% de acrilamida y 0.2% de gelatina (Tabla 4) y se cargaron en las ramas del gradientero. Se abrió la llave que comunica ambas ramas y las disoluciones se bombearon a velocidad 4 hacia el formador de geles. El gel de separación se dejó polimerizar durante 45 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se preparó el gel de concentración al 4% en acrilamida (Tabla 4) y se dejó polimerizar con los peines colocados para formar los pocillos del gel.

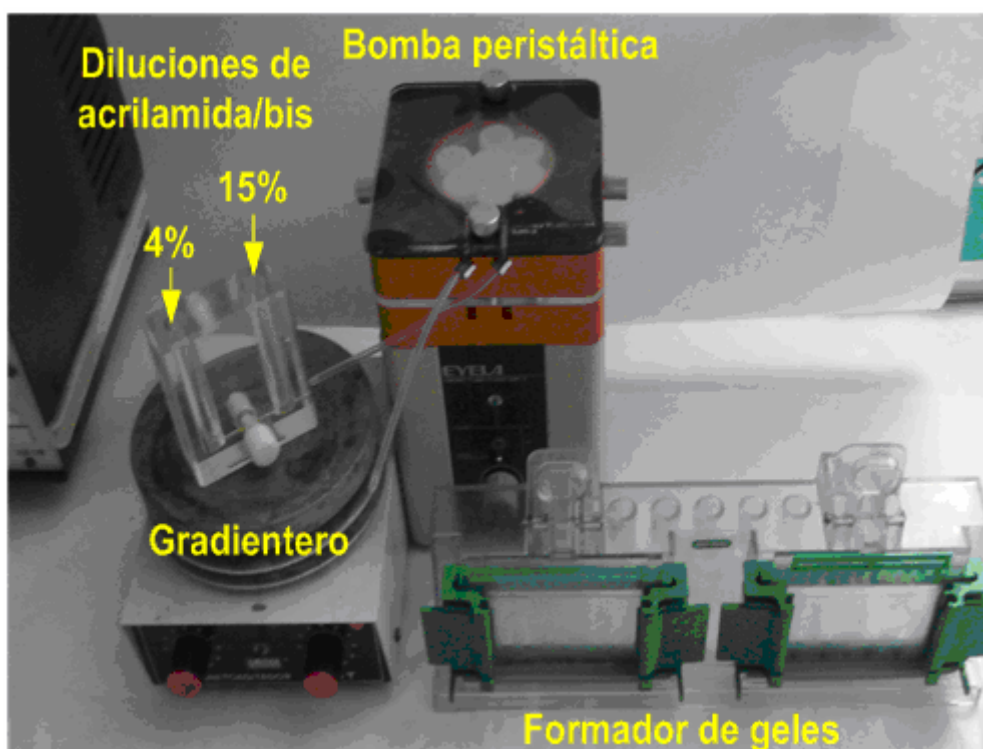


Figura 11. Sistema de preparación de geles en gradiente.

Tabla 4. Composición de los geles de separación y concentración para la cuantificación de MMP-2 y MMP-9 mediante zimografía.

Gel	Composición (μL)	
	4%	15%
<u>Separación</u>		
Glicerol	195.5	195.5
Agua bidestilada	1184.8	566.7
Gelatina (10% p/v)	45.0	45.0
Acrilamida (40% p/v)	224.7	842.8
Tampón Tris-HCl (1.5 M, pH=8.8)	562.5	562.5
SDS (10% p/v)	22.5	22.5
---- Mezclado ----		
Persulfato de amonio (10% p/v)	11.3	11.3
TEMED	1.2	1.2
<u>Concentración</u>		
Agua bidestilada	2255.0	
Acrilamida (40% p/v)	292.5	
Tampón Tris-HCl (0.5 M, pH=6.8)	422.5	
SDS (10% p/v)	30.0	
---- Mezclado ----		
Persulfato de amonio (10% p/v)	15.0	
TEMED	3.0	

9.2. Protocolo experimental

El protocolo experimental seguido para cuantificar la actividad de las MMP-2 y MMP-9 incluyó cuatro etapas:

1. Separación electroforética de las proteínas plasmáticas

Se llevó a cabo en un Mini-PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad) a 200V x 1 hora, manteniendo el tampón de electroforesis en todo momento frío para evitar la deformación en la separación de las proteínas. El tampón de electroforesis (10X) se preparó mezclando 30.3 g de tris base, 144 g de glicina y 10 g de SDS en un litro de disolución. Este tampón se diluyó a 1X antes de su uso.

Se cargó Un volumen definido de plasma que nos diera 100 µg de proteína.

2. Re-naturalización de las proteínas plasmáticas

Comprendió la eliminación del detergente SDS incluyendo tanto en el gel como en el tampón de electroforesis. Para tal efecto, el gel, una vez quitado las placas de cristal del formador, se lavó dos veces con agua y una vez con 40 mL de NONIDET P (2.5% v/v) durante 30 minutos bajo agitación orbital.

3. Reacción de proteólisis

El gel exento de SDS se incubó en tampón Tris-HCl 0.1 M pH=7.4 que a su vez contiene 0.05 M de CaCl₂ a 37°C durante 24 horas.

4. Detección de las metaloproteinasas

El gel se lavó dos veces con agua y se tiñó con el colorante Coomassie Safe de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante (Bio-Rad). La MMP-2 y la MMP-9 se identificaron en función a sus pesos moleculares por comparación con el marcador de proteínas cargada simultáneamente con las muestras.

9.3. Cálculos

Las bandas de color blanco formado como consecuencia de la hidrólisis de la gelatina catalizada por la MMP-2 y MMP-9 se analizaron mediante la opción de Analyze/Gel del programa de análisis de imagen Image J. (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>)

10. Determinación del contenido de proteínas

El contenido de proteínas de las muestras de plasma se midió empleando el método de Bradford adaptado a un lector de placa. De acuerdo al protocolo descrito por el fabricante, 10 μL de muestra diluida se hizo reaccionar con 200 μL del reactivo de Bradford (colorante de azul Coomassie, Bio-Rad, España) diluido 5 veces y después de 5 minutos se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de placas (Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader, Biotek, Rochester, VT, USA). La concentración de proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) se estimó a partir de una recta de calibración preparada usando albumina de suero de bovino en el rango de 0.1-0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

11. Análisis estadístico

11.1. Estadística descriptiva, prueba de comparación de media, análisis de regresión y pruebas de normalidad

Los datos se expresaron como el promedio y su correspondiente error estándar de la media como medida de dispersión. El análisis de varianza de una vía (*One-Way*) y las prueba de comparación de medias de *Bonferroni*, así como los análisis de regresión lineal se realizaron en el programa estadístico GraphPad Prism (GraphPad software, CA, USA). El análisis de la normalidad y la normalización de los parámetros antioxidantes/oxidación se realizó en el SPSS Statistics versión 19 (IBM Company).

11.2. Cálculo del indicador global de estrés oxidativo plasmático en insuficiencia venosa

Los diversos biomarcadores del sistema de defensa antioxidante no enzimático y enzimático; así como, los indicadores de daño oxidativo plasmático discriminantes se incorporaron en un indicador global de estrés

oxidativo siguiendo la metodología estadística descrito recientemente (Veglia et al., 2010), el mismo que constó de las siguientes etapas:

1. Análisis de normalidad de los parámetros

La normalidad de los parámetros antioxidantes y los biomarcadores de daño oxidativo se analizaron mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y las graficas Q-Q.

2. Transformación de los parámetros con distribución no normal

Los parámetros con distribución no normal se normalizaron mediante transformación logarítmica. La normalidad de los parámetros transformados se constató mediante el análisis estadístico descrito anteriormente.

3. Estandarización de los parámetros originales y normalizados

La estandarización de los parámetros busco hacer comparables los mismos, dado que se expresan en diferentes unidades. Los datos individuales de los parámetros antioxidantes/oxidantes de los tres grupos experimentales, controles y pacientes con várices primarias y recidivantes, se estandarizaron mediante la siguiente ecuación (7):

$$Z_{ij} = \left(\frac{x_{ij} - m_j}{s_j} \right) \quad (7)$$

Donde: Z_{ij} es el valor estandarizado del parámetro j del sujeto experimental i ; X_{ij} es el valor del parámetro j original o normalizado mediante transformación logarítmica; m_j es el promedio del parámetro j y s_j es la desviación estándar del parámetro j en los sujetos control.

4. Cálculo del indicador global

El indicador global de estrés oxidativo plasmático en insuficiencia venosa (OxyVen) se cálculo mediante la ecuación 8. El OxyVen se calculo como el valor promedio $\pm$ desviación estándar para cada grupo experimental. El indicador de daño oxidativo (OXY) y el de protección antioxidante (ANTIOX) se dedujeron del promedio de los parámetros individuales. Un valor del OxyVen igual a cero o próximo a él significa que existe un balance entre los antioxidantes/daño oxidativo y evidentemente es el que tendría el grupo control; en tanto, que valores superiores está relacionado con situaciones de estrés oxidativo.

$$OxyVen_n = \text{Promedio} (\overline{ANTIOX_{ik}} - \overline{OXY_{im}})_n \quad (8)$$

Donde: n es el grupo experimental; i es el sujeto individual; k son los parámetros relacionados con el sistema de defensa antioxidante; m son los parámetros de daño oxidativo.

RESULTADOS

A. CARACTERIZACIÓN DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO

1. Inclusión de pacientes.

Se obtuvieron muestras de sangre venosa de un total de 84 pacientes y sujetos control de los cuales sólo se utilizaron en el estudio aquellos que cumplían los criterios de inclusión descritos en materiales y métodos (Tabla 2), excluyéndose a todos aquellos con enfermedades asociadas con el estrés oxidativo (EAEO), como obesidad, hipertensión, diabetes o tabaquismo, entre otras.

Las características demográficas y clínicas de los sujetos incluidos en el presente estudio se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Datos demográficos y clínicos de los sujetos experimentales.

	Varices primarias (n=9)	Varices recidivantes (n=8)	Sujetos control (n=10)
Edad	39,7 años (25/51)	41.5 años (29/56)	33.0 años (24/45)
Sexo	V (55,6 %) M (44,4 %)	V (37,5 %) M (62,5 %)	V (20 %) M (80 %)
CEAP	2 (100 %)	2 (87,5 %) 3 (12,5 %)	0 (0 %) 0 (0 %)
EAEO	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
ASA	I (100 %)	I (100 %)	No

V: Varones; M= Mujeres. Entre paréntesis se muestran los intervalos de edad y los porcentajes de varones y mujeres. Los pacientes se clasificaron de acuerdo con los criterios CEAP. EAEO, Enfermedades asociadas con estrés oxidativo. ASA, Sistema de clasificación que utiliza la American Society of Anesthesiologists para estimar el riesgo que plantea la anestesia para los distintos estados del paciente.

2. Estudio Eco-Doppler color.

2.1. Características de los sujetos control.

Los 10 sujetos control presentaron al examen Eco-Doppler color venoso ausencia de signos morfológicos y/o funcionales de insuficiencia venosa en los sistemas venosos superficial y profundo, así mismo la medición de los diámetros venosos de las venas safenas se hallaron dentro de rangos de la normalidad. En la Tabla 6 se muestran los diámetros venosos en el miembro inferior derecho e izquierdo.

Tabla 6. Diámetros venosos en los miembros inferiores de sujetos control.

Diámetros venosos	Miembro inferior derecho	Miembro inferior izquierdo
Cayado safeno interno	4,3 mm (3,4/5,4)	4,4 mm (2,5/7,6)
Eje safeno interno	3,6 mm (3,0/4,5)	3,3 mm (1,7/4,4)
Safena externa	3,5 mm (2,2/4,6)	3,4 mm (2,2/4,7)

Se muestra el valor medio y los rangos de medida de los diámetros venosos de los sujetos experimentales control; n=10.

2.2. Características de los pacientes con varices primarias.

Este estudio demostró que el 100% de los pacientes con varices primarias presentaron incompetencia y dilatación de cayados y ejes safenos. El 77.8% de los pacientes con IVC de varices primarias presentaron alteraciones de la vena safena interna y el 22.2% de la vena safena externa. En todos los casos, las varices de troncos safenos fueron acompañados de colaterales varicosas. El diámetro promedio del cayado en estos pacientes fue de 8.9 mm, con un rango entre los 6.6 y los 12.3 mm (Tabla 7).

Tabla 7. Características del sistema venoso de pacientes con varices primarias.

Varices primarias	
Vena safena interna y colaterales varicosas	77,8 %
Vena safena externa y colaterales varicosas	22,2 %
Diámetro de cayado	8,9 mm (6,6/12,3 mm)
Sistema venoso profundo permeables y competentes	100 %

N=9.

2.3. Características de los pacientes con varices recidivantes.

Mediante el examen de Eco Doppler color se observó que los pacientes portadores de varices recidivantes presentaron diversas características anatomopatológicas que se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Características del sistema venoso de pacientes con varices recidivantes

Varices recidivantes	
Neo cayado, safena interna y colaterales varicosas	25.0 %
Neo cayado, safena anterior y colaterales varicosas	12,5 %
Cayado, safena interna y colaterales varicosas	12,5 %
Ausencia safena interna, presencia de safena externa y colaterales varicosas	12,5 %
Ausencia de safena interna y colaterales varicosas bilaterales	12,5 %
Ausencia de safena interna y colaterales varicosas unilateral	12,5 %
Ausencia de safena interna y safena externa, colaterales varicosas	12,5 %
Sistema venoso profundo permeables y competentes	100 %

N=8.

B. ESTUDIO DEL ESTATUS ANTIOXIDANTE Y PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO PLASMÁTICO

1. Capacidad antioxidante no enzimática total del plasma

1.1. Capacidad antioxidante total mediada mediante fluorescencia (ORAC)

En ausencia del plasma se produce una pérdida gradual de la fluorescencia inducida por radicales peroxilos a lo largo del tiempo, la cual es total a los 50 minutos. En presencia de plasma esta pérdida de fluorescencia se retrasa, lo que indica la presencia de sustancias antioxidantes no enzimáticas. Con objeto de valorar las diferencias entre los grupos experimentales se determinó el valor ORAC teniendo en cuenta las áreas bajo la curva de la fluorescencia relativa frente al tiempo (Figura 12).

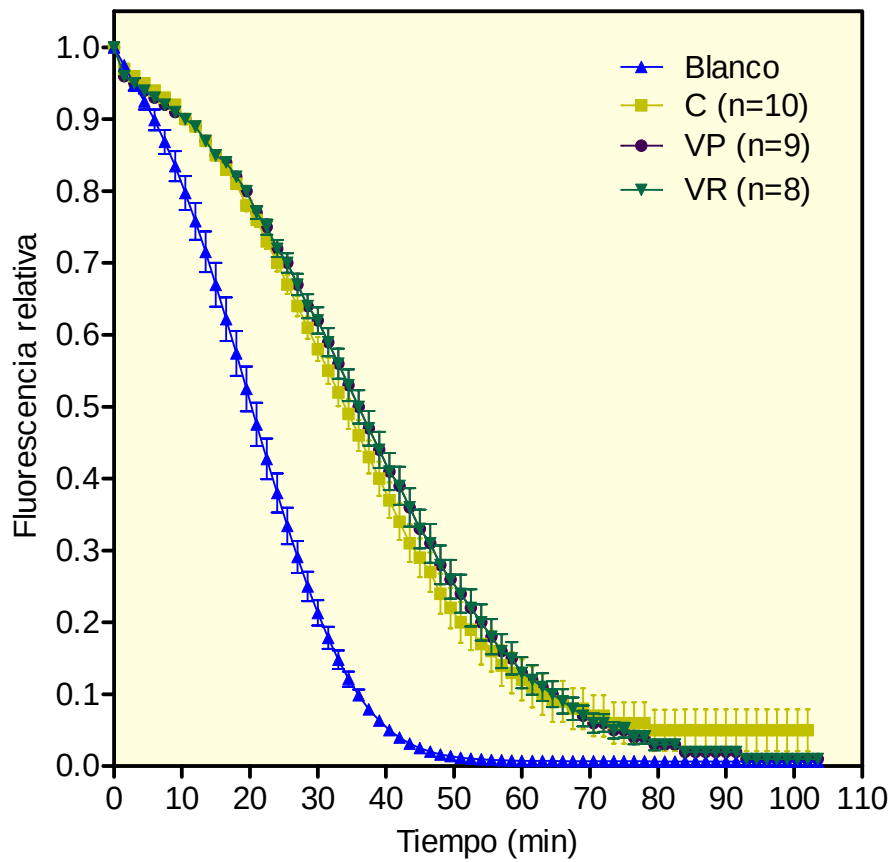


Figura 12. Curvas de disminución de fluorescencia inducida por radicales peroxilos en ausencia de antioxidantes (Blanco) y en presencia de plasma diluido de controles (C) y pacientes con varices primarias (VP) y varices recidivantes (VR). Los datos representan el valor promedio y las barras de error el SEM (error estándar de la media). Entre paréntesis se indica el número de sujetos experimentales.

En la figura 13 se muestra que no hubo diferencias significativas en la capacidad antioxidante total medida mediante el valor ORAC entre los plasmas de sujetos control y pacientes con varices primarias o recidivantes.

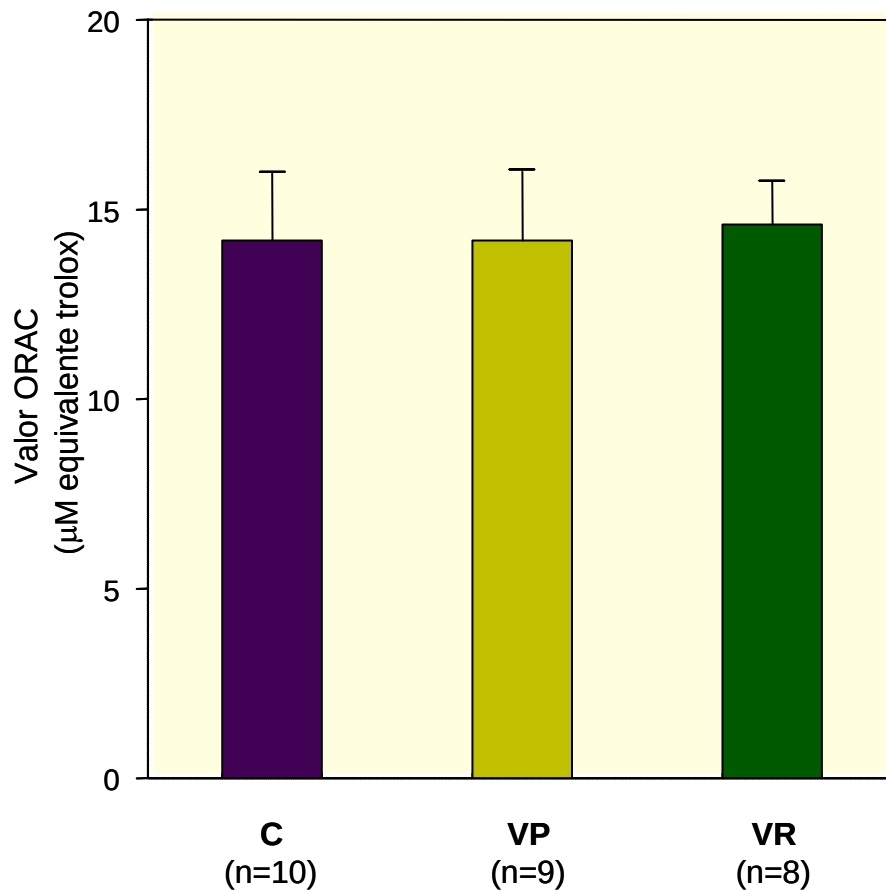


Figura 13. Valores ORAC plasmático en controles (C) y pacientes con varices primarias (VP) y varices recidivantes (VR). Los datos representan el valor promedio y las barras de error el SEM (error estándar de la media). Entre paréntesis se indica el número de sujetos experimentales.

1.2. Capacidad antioxidante total medida por luminiscencia (TAC).

Se utilizó un segundo método de medida de la capacidad antioxidante total basado en la señal de luminiscencia producida por el luminol oxidado, la cual cae tras la adición del plasma debido a la presencia de antioxidantes. La rapidez de recuperación de la luminiscencia es inversamente proporcional a la concentración de antioxidantes no enzimáticos de la muestra. En la figura 14 se observa que las muestras de pacientes con varices recidivantes presentan menos capacidad antioxidante en comparación con las muestras control y las de varices primarias.

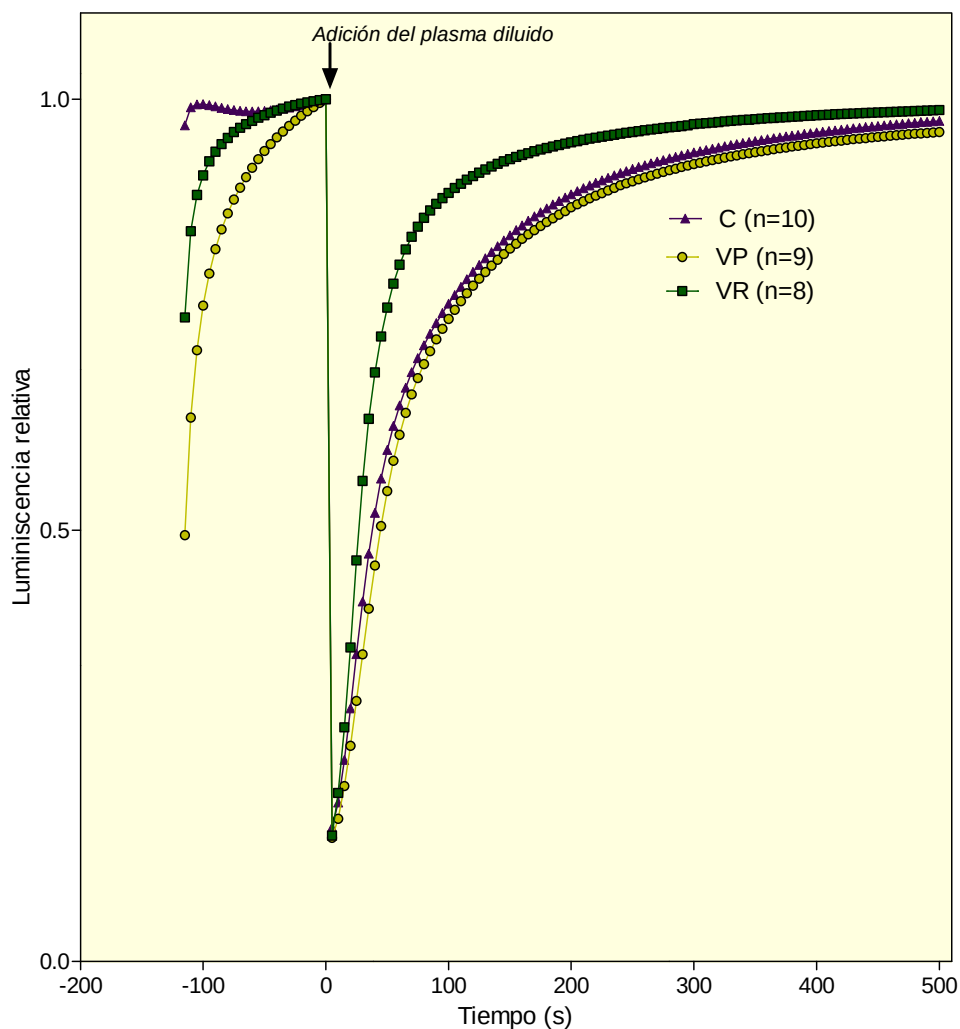


Figura 14. Variación de la señal de luminiscencia después de la adición de plasma diluido de controles (C) y pacientes con varices primarias (VP) y varices recidivantes

(VR). Los datos representan el valor promedio, en todos los casos el coeficiente de variabilidad como medida de dispersión es inferior al 10%. Entre paréntesis se indica el número de sujetos experimentales.

La capacidad antioxidante total medida en equivalentes de Trolox y calculada en base al área bajo la curva de los datos transformados de la Figura 15, indica que no hay diferencias estadísticamente significativa entre la capacidad antioxidante total (TAC) de los sujetos controles y de los pacientes con varices primarias. Sin embargo, el plasma de pacientes con varices recidivantes presenta un valor TAC significativamente menor con respecto a los otros dos grupos experimentales (Figura 15).

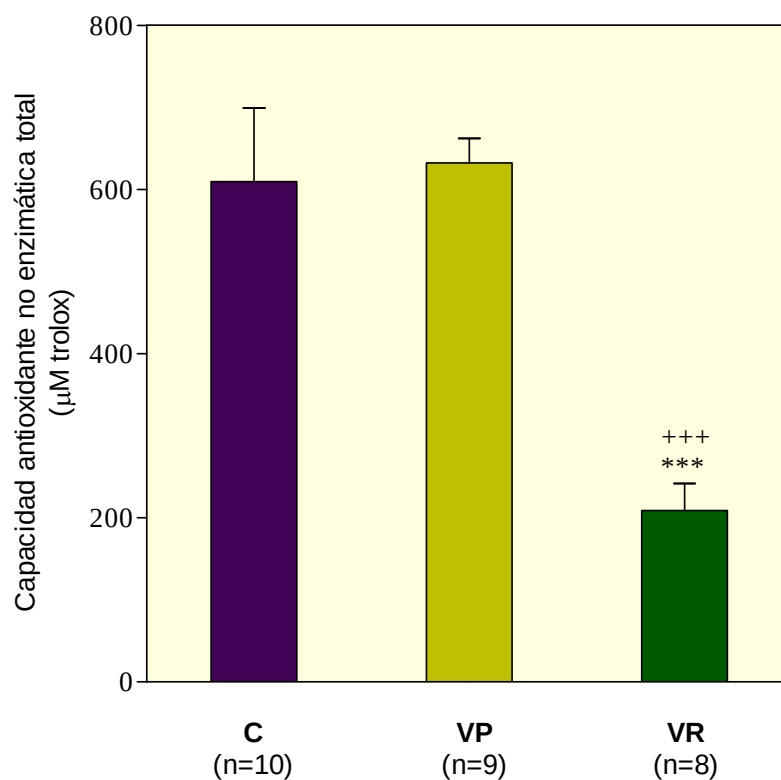


Figura 15. Valores TAC plasmático en controles (C) y pacientes con varices primarias (VP) y varices recidivantes (VR). Los datos representan el valor promedio y las barras de error el SEM (error estándar de la media). Entre paréntesis se indica el número de sujetos experimentales.* significa diferencia estadística de VP y VR respecto a los controles y + entre VP y VR. *** $p < 0.001$ y +++ $p < 0.01$.

2. Niveles de antioxidantes no enzimáticos plasmáticos

2.1. Glutación reducido.

Los niveles plasmáticos de glutación reducido fueron similares entre sujetos control y sujetos con varices primarias (VP). Los sujetos con varices recidivantes (VR) presentaron niveles significativamente menores de glutación reducido en comparación con el control y VP (Figura 16).

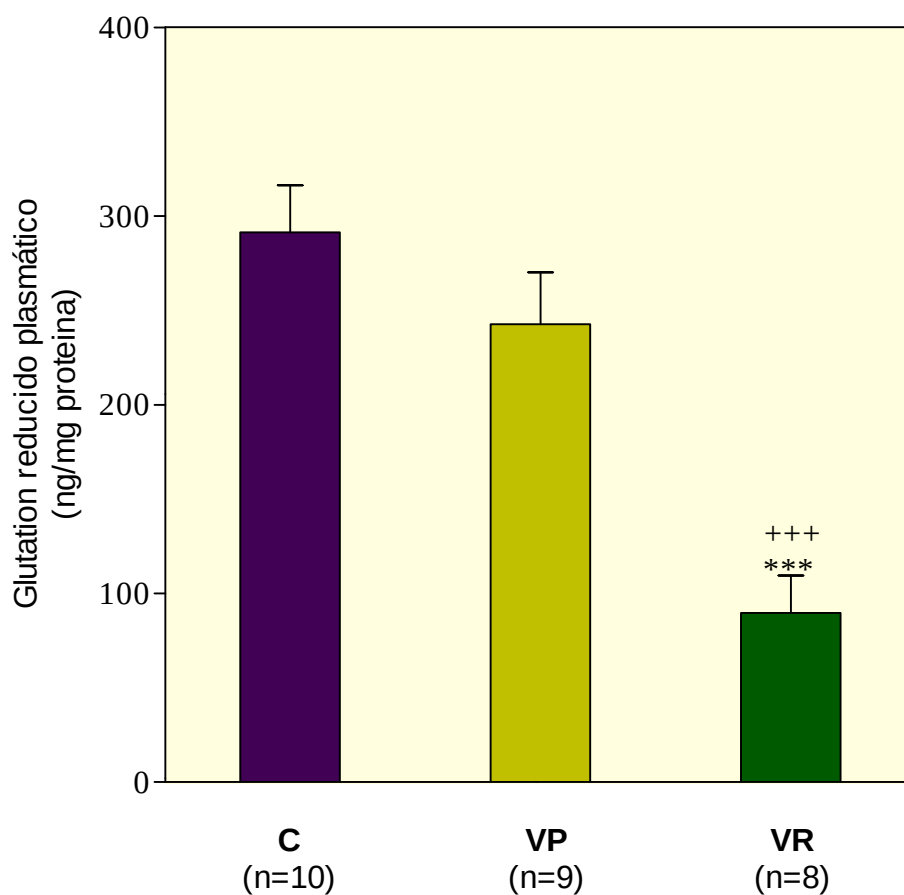


Figura 16. Niveles de glutación reducido plasmático en controles (C) y pacientes con varices primarias (VP) y varices recidivantes (VR). Los datos representan el valor promedio y las barras de error el SEM (error estándar de la media). Entre paréntesis se indica el número de sujetos experimentales. * significa diferencia estadística de VP y VR respecto a los controles y + entre VP y VR. *** $p < 0.001$ y +++ $p < 0.01$.

2.2. Ácido úrico.

Los niveles plasmáticos de ácido úrico fueron similares entre sujetos control y sujetos con varices, tanto primarias como recidivantes (Figura 17).

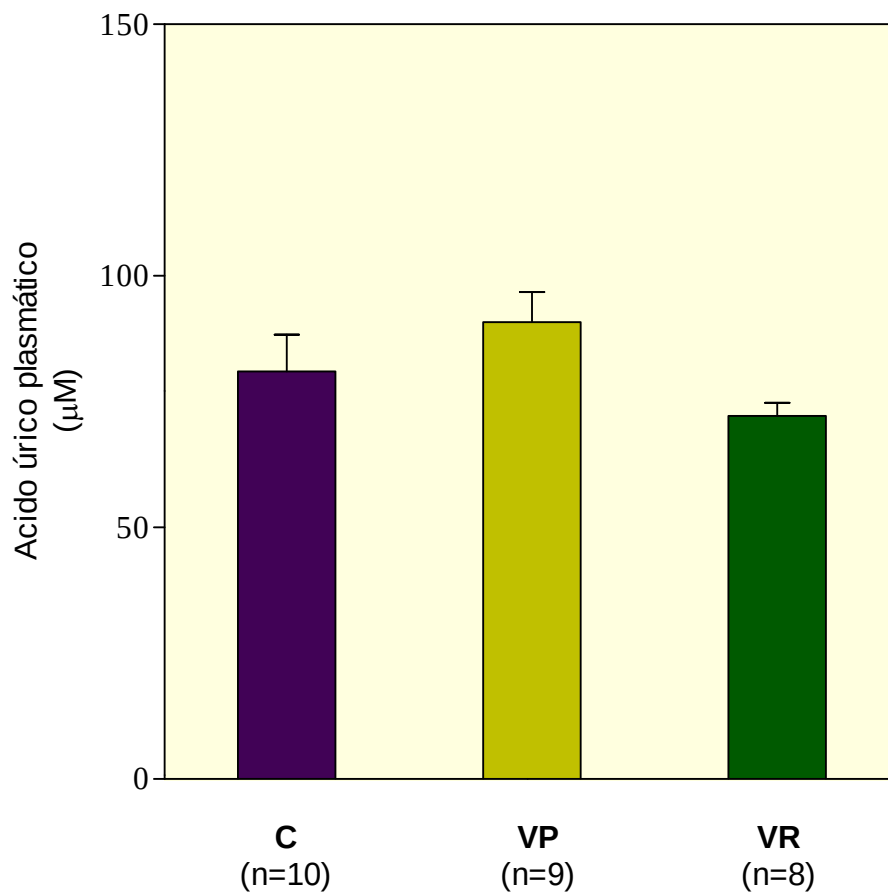


Figura 17. Niveles de ácido úrico plasmático en controles (C) y pacientes con varices primarias (VP) y varices recidivantes (VR). Los datos representan el valor promedio y las barras de error el SEM (error estándar de la media). Entre paréntesis se indica el número de sujetos experimentales.

3. Actividad catalasa en el plasma.

La actividad catalasa fue significativamente menor en muestras de pacientes con varices tanto primarias como recidivantes, con respecto al plasma de sujetos control. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre el plasma de sujetos con varices primarias y recidivantes (Figura 18).

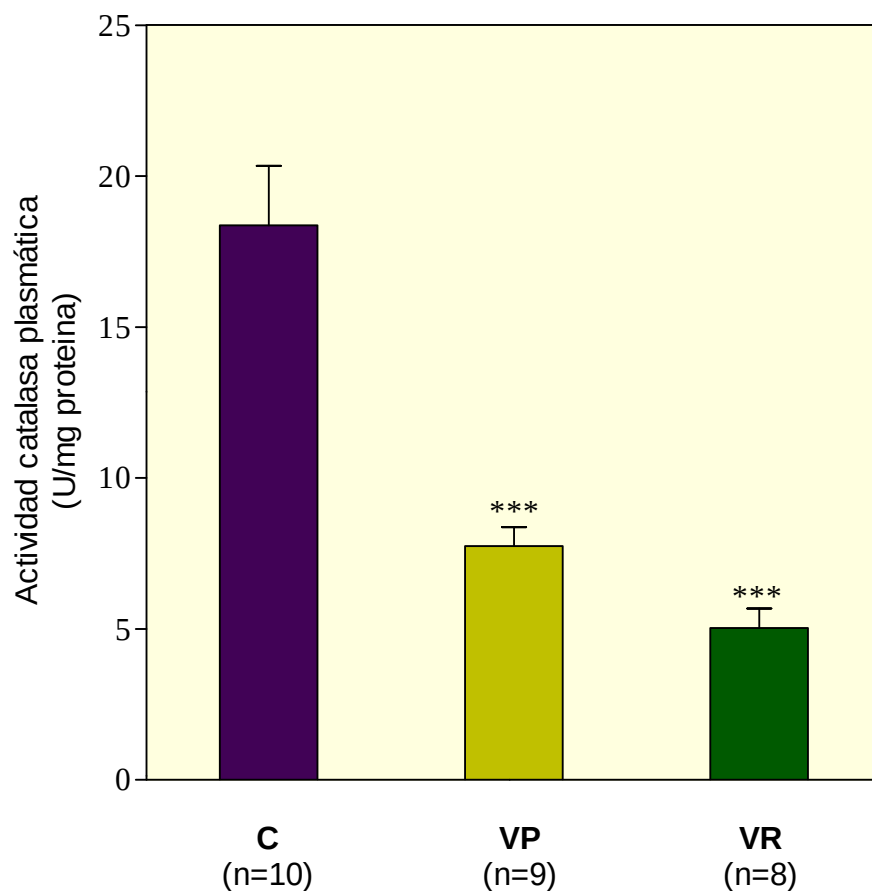


Figura 18. Actividad catalasa plasmático en controles (C) y pacientes con varices primarias (VP) y varices recidivantes (VR). Los datos representan el valor promedio y las barras de error el SEM (error estándar de la media). Entre paréntesis se indica el número de sujetos experimentales. * significa diferencia estadística de VP y VR respecto a los controles. *** $p < 0.001$.

4. Oxidación de proteínas plasmáticas

La oxidación de proteínas plasmáticas se determinó mediante la detección de proteínas carboniladas y malondialdehído (MDA).

4.1. Proteínas carboniladas

La cantidad de proteínas carboniladas fue significativamente mayor en muestras de pacientes con varices primarias con respecto a sujetos control. Sin embargo, no hubo diferencia estadística significativa entre pacientes con varices recidivantes y sujetos control (Figura 19).

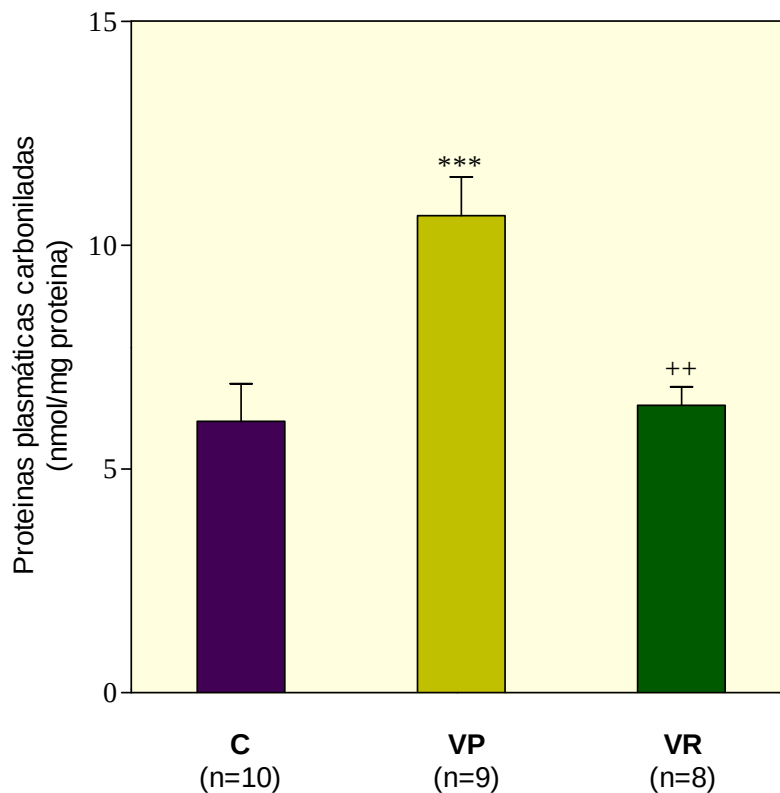


Figura 19. Proteínas plasmáticas carboniladas en controles (C) y pacientes con varices primarias (VP) y varices recidivantes (VR). Los datos representan el valor promedio y las barras de error el SEM (error estándar de la media). Entre paréntesis se indica el número de sujetos experimentales. * significa diferencia estadística de VP y VR respecto a los controles y + entre VP y VR. *** $p < 0.001$ y ++ $p < 0.01$.

4.2. Proteínas modificadas por MDA.

La oxidación de las proteínas plasmáticas producido por MDA siguió un patrón similar al mostrado en la figura anterior que muestra la oxidación total de proteínas. Fue significativamente mayor en muestras de pacientes con varices primarias con respecto a sujetos control y similar entre sujetos con varices recidivantes y control (Figura 20).

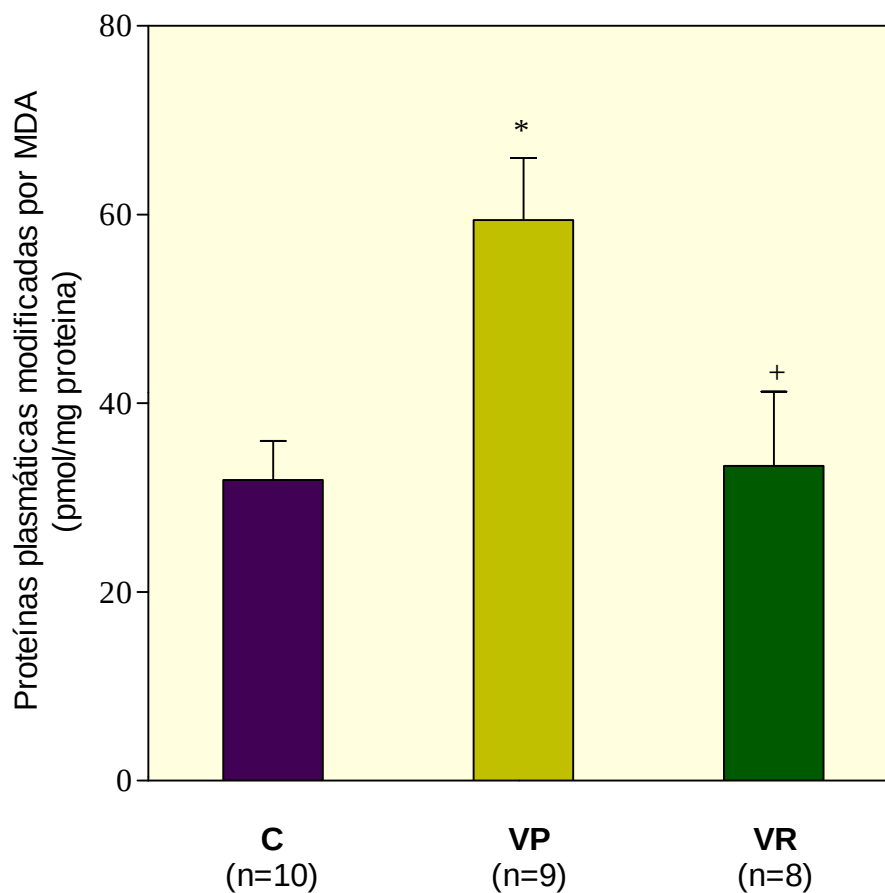


Figura 20. Proteínas plasmáticas modificadas por MDA en controles (C) y pacientes con varices primarias (VP) y varices recidivantes (VR). Los datos representan el valor promedio y las barras de error el SEM (error estándar de la media). Entre paréntesis se indica el número de sujetos experimentales. * significa diferencia estadística de VP y VR respecto a los controles y + entre VP y VR. * $p < 0.05$ y + $p < 0.05$.

4.3. Productos avanzados de oxidación de proteínas (AOPP)

La concentración de AOPP en plasma se midió mediante un método espectroscópico. No hubo diferencias significativas entre los 3 grupos experimentales (Figura 21).

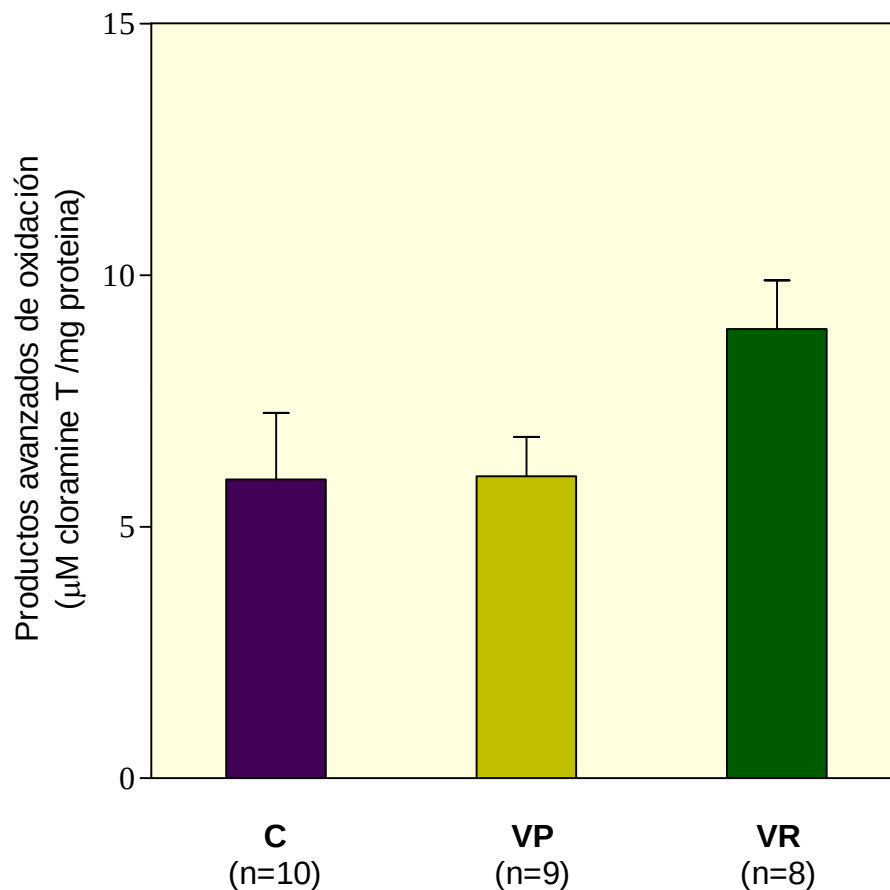


Figura 21. Productos avanzados de oxidación de proteínas plasmáticas en controles (C) y pacientes con varices primarias (VP) y varices recidivantes (VR). Los datos representan el valor promedio y las barras de error el SEM (error estándar de la media). Entre paréntesis se indica el número de sujetos experimentales.

5. Actividad de enzimas productoras de radicales libres

5.1. Xantina oxidasa

No hubo diferencias significativas entre los 3 grupos experimentales en cuanto a la actividad de la xantina oxidasa (Figura 22).

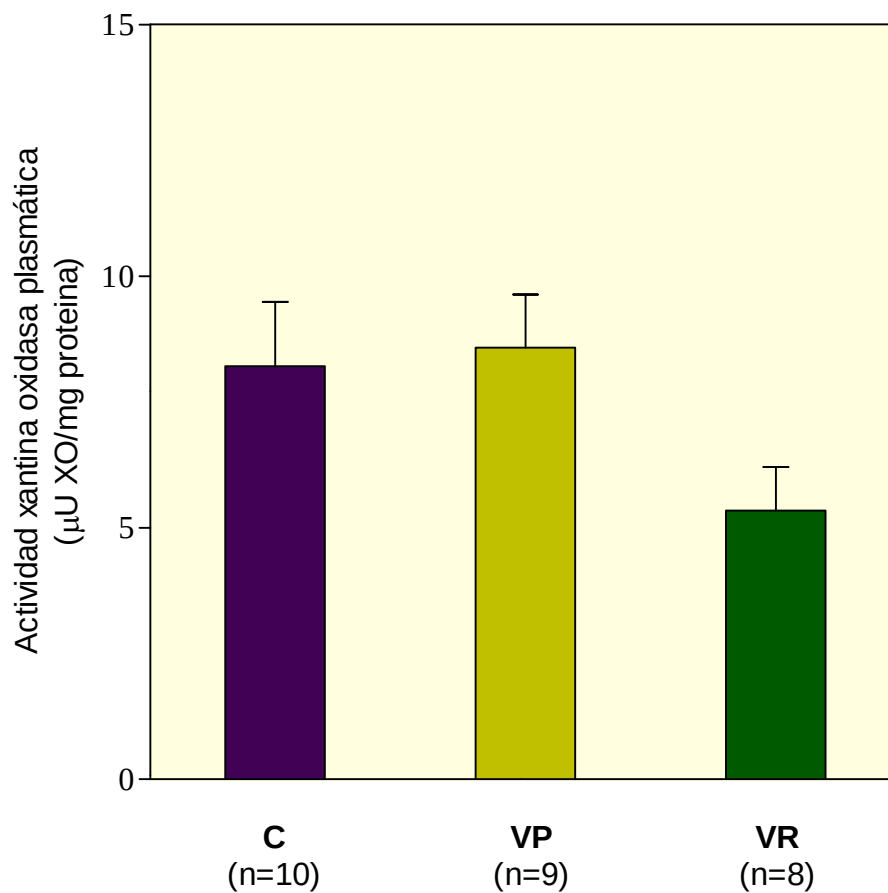


Figura 22. Actividad xantina oxidasa plasmática en controles (C) y pacientes con varices primarias (VP) y varices recidivantes (VR). Los datos representan el valor promedio y las barras de error el SEM (error estándar de la media). Entre paréntesis se indica el número de sujetos experimentales.

5.2. Mieloperoxidasa

De forma similar a los resultados con xantina oxidasa, tampoco hubo diferencias significativas entre los 3 grupos experimentales en cuanto a la actividad mieloperoxidasa (Figura 23).

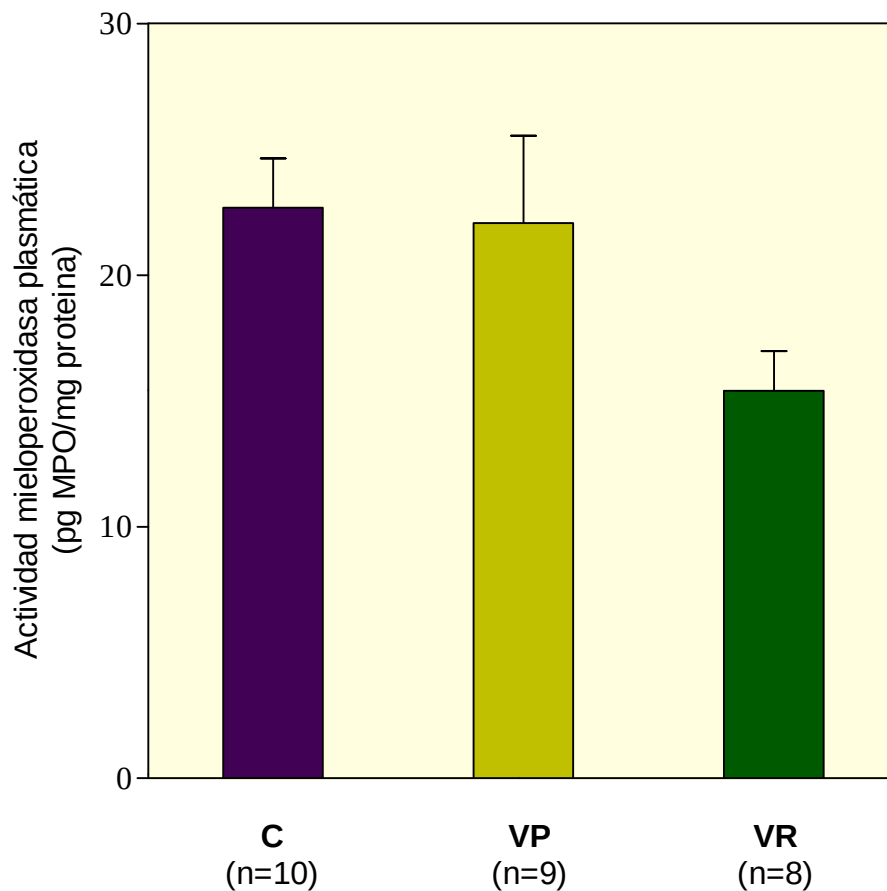


Figura 23. Actividad mieloperoxidasa plasmática en controles (C) y pacientes con varices primarias (VP) y varices recidivantes (VR). Los datos representan el valor promedio y las barras de error el SEM (error estándar de la media). Entre paréntesis se indica el número de sujetos experimentales.

6. Actividad de las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9.

Se determinaron posibles diferencias en la actividad de las metaloproteasas MMP-9 y MMP-2 plasmática entre pacientes con varices

primarias y pacientes con varices recidivantes. La actividad de la MMP-9 fue significativamente mayor en plasma de pacientes con varices primarias respecto del plasma de pacientes con varices recidivantes. Aunque no hubo diferencias significativas entre la actividad MMP-2 de ambos grupos experimentales, se observó una tendencia a una mayor actividad en plasma de pacientes con varices primarias (Figura 24).

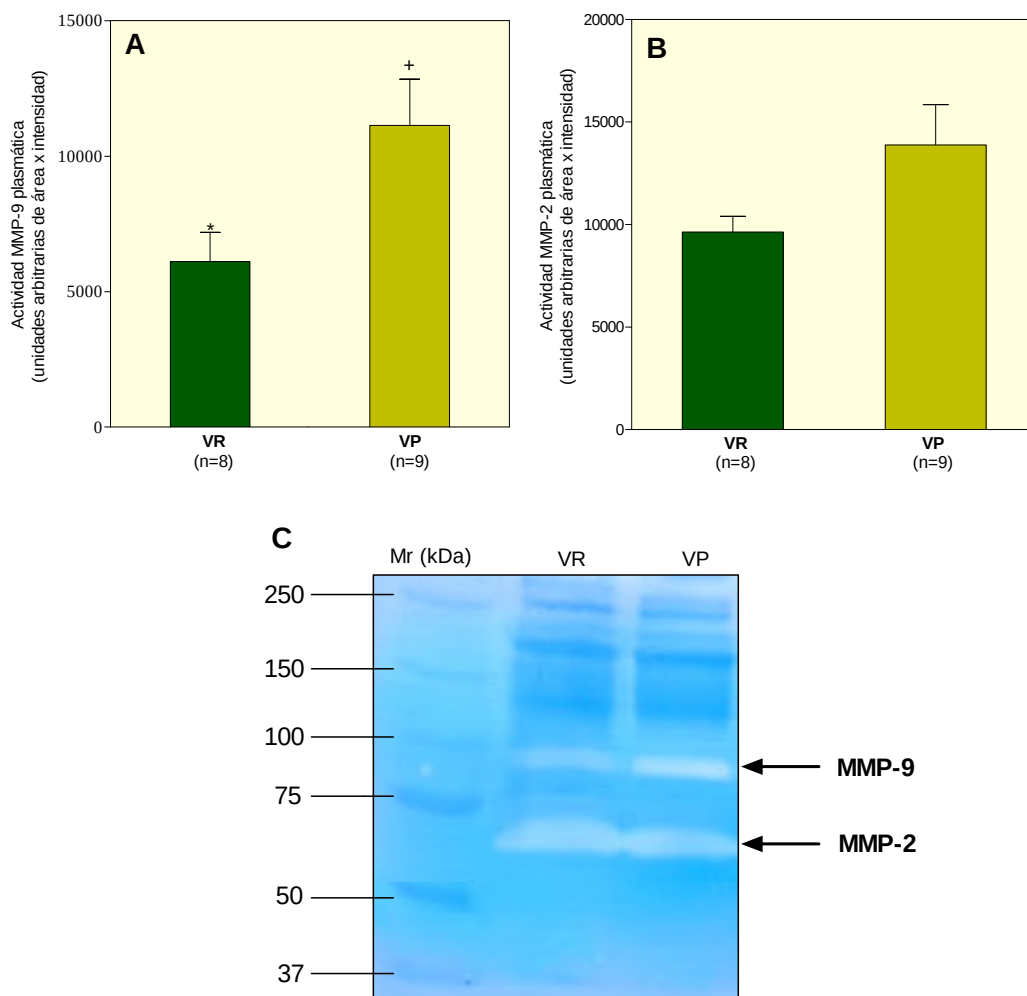


Figura 24. Actividad de metaloproteinasas plasmáticas A) MMP-9 y B) MMP-2 en controles (C) y pacientes con varices primarias (VP) y varices recidivantes (VR). C) Zimografía de las muestras de plasma de pacientes con varices que evidencia la presencia de MMPs. Los datos representan el valor promedio y las barras de error el SEM (error estándar de la media). + significa diferencia estadística entre VP y VR. * $p < 0.05$ y + $p < 0.05$. Entre paréntesis se indica el número de sujetos experimentales.

C. INDICADOR GLOBAL DE ESTRÉS OXIDATIVO EN INSUFICIENCIA VENOSA

Basado en los parámetros de capacidad antioxidante y biomarcadores de estrés oxidativo individuales anteriormente expuestos, se calculó un indicador global de estrés oxidativo específico para insuficiencia venosa, que denominamos OXyVen. Para ello se realizaron los siguientes pasos:

1. Análisis de normalidad de los parámetros.

La significación de la prueba de Kolmogorov-Smirnov usada para determinar la normalidad de los parámetros incluidos en el OxyVen se muestran en la Tabla 9. Los datos experimentales de todos los parámetros medidos tuvieron una distribución normal, excepto la actividad catalasa plasmática y la oxidación de proteínas modificadas por MDA, los cuales se normalizaron mediante transformación logarítmica. Las gráficas Q-Q permitieron confirmar la normalidad de todos los parámetros incluidos en el OXyVen (Figura 25).

Tabla 9. Prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov de los parámetros incluidos en el OxyVen

	Kolmogorov-Smirnov ^a		
	Estadístico	gl	Sig.
GSH	0,098	27	0,200*
TAC	0,089	27	0,200*
Catalasa	0,239	27	0,000
Carbonilos	0,130	27	0,200*
MDA	0,161	27	0,072

a. Corrección de la significación de Lilliefors

*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

La normalidad de los parámetros antioxidantes y los biomarcadores de daño oxidativo se analizaron mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y las graficas Q-Q.

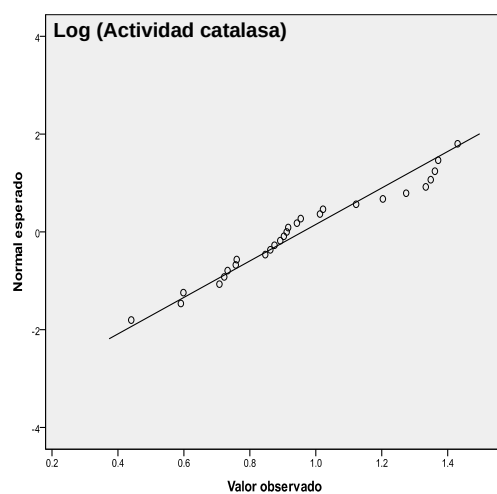
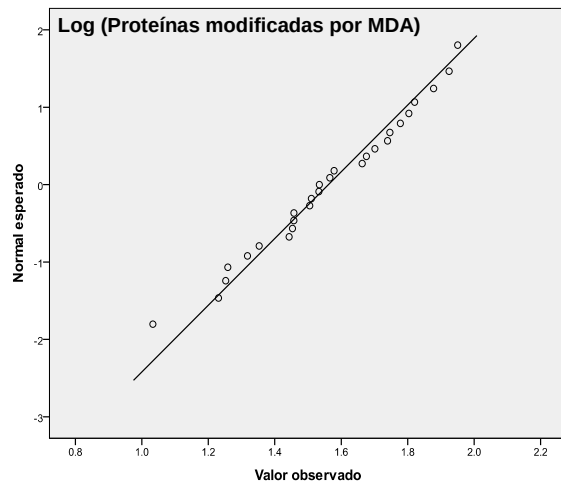
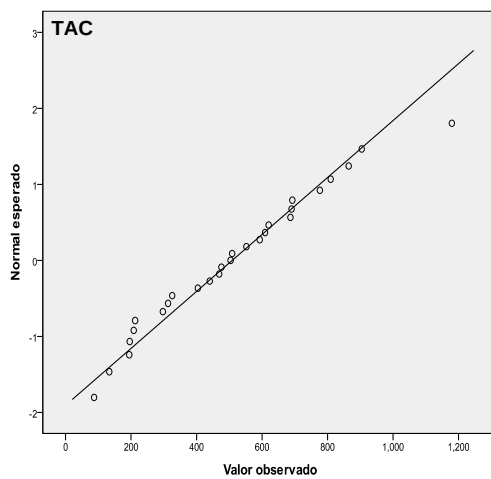
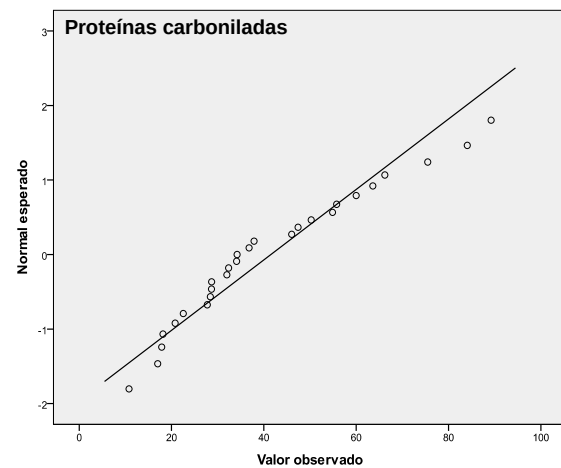
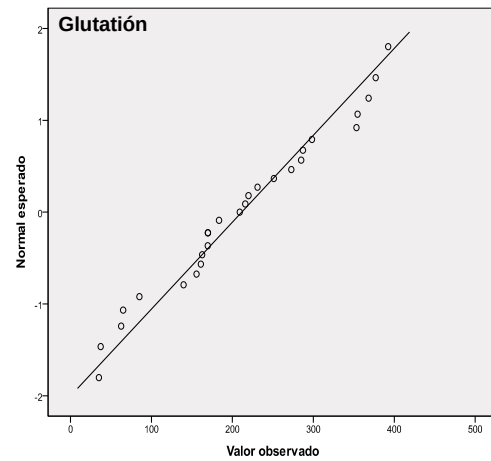


Figura 25. Gráficas Q-Q de normalidad de los parámetros incluidos en el OXYVen.

2. Estandarización de los parámetros originales y normalizados.

Una vez normalizados todos los parámetros se realizó la estandarización de los mismos a efectos de hacerlos comparables dado que estos parámetros están expresados en diferentes unidades. En la Tabla 10 se muestran los parámetros estandarizados.

3. Cálculo del OXYVen.

El OXYVen se calculó en base a dos indicadores, uno de protección antioxidante, que hemos denominado ANTIOX y otro relacionado con el daño oxidativo que hemos denominado OXY.

En el indicador OXY se incluyeron los parámetros individuales estandarizados de oxidación de proteínas (proteínas carboniladas y el logaritmo de las proteínas modificadas por MDA). El plasma de pacientes con varices primarias muestra un valor absoluto del indicador de daño oxidativo significativamente mayor que el de sujetos control. Asimismo, el valor de OXY es también mayor en plasma de pacientes con varices primarias en comparación con varices recidivantes. Tabla 10.

En el indicador ANTIOX se incluyeron los parámetros individuales estandarizados de los antioxidantes no enzimáticos (glutathion y TAC) y enzimáticos (el logaritmo de la actividad catalasa). El plasma de pacientes con varices primarias, muestra un valor absoluto del indicador de protección antioxidante, ANTIOX más cercano al control. en comparación con el plasma de pacientes con varices recidivantes Tabla 10.

Para los sujetos control el valor de OXYVen= 0, lo que constituye el valor de referencia, es decir, que existe un equilibrio entre la capacidad antioxidante y la producción de radicales libres medido a través del daño oxidativo. Cuanto más aleja el valor absoluto del OXYVen de este valor de referencia mayor es el

estrés oxidativo global. Los valores absolutos de OXyVen del plasma de pacientes con varices primarias y recidivantes fueron significativamente diferentes del control ($p < 0.001$), sin diferencias estadísticas entre ambos grupos de pacientes ($p > 0.05$).

Tabla 10. Parámetros estandarizados					
Grupos experimentales	Glutation reducido	TAC	Log (Actividad catalasa)	Proteínas carboniladas	Log (Proteínas modificadas por MDA)
Controles	-1.599	-0.848	-1.309	0.304	-1.444
	-0.930	-0.589	1.134	1.466	0.324
	-0.420	-0.614	0.727	-0.238	1.561
	-1.029	-0.717	0.204	-1.023	-1.267
	0.070	-0.170	-1.890	-0.404	-0.206
	0.264	0.487	0.669	-0.149	-0.088
	0.101	0.945	-0.204	-1.919	-0.913
	1.060	0.803	0.785	1.023	0.619
	1.079	1.931	-0.669	0.857	1.208
	1.404	-1.229	0.553	0.083	0.206
ANTIOX	0.000 (0.671)				
OXY	0.000 (0.866)				
OXYVen	0.000 (0.812)				
VP	-0.712	-0.073	-2.123	4.319	2.386
	-0.873	-0.472	-2.763	4.175	2.033
	-1.400	-0.489	-1.250	2.173	1.090
	-1.701	-0.112	-2.007	8.268	-0.088
	-1.599	0.178	-1.832	5.281	1.326
	-1.602	0.166	-1.948	4.728	1.620
	-0.106	0.606	-2.763	8.732	1.915
	1.627	0.187	-1.716	3.091	2.799
	1.276	-0.316	-1.658	2.848	1.797
ANTIOX	- 0.869 (0.3250)**				
OXY	3.250 (1.038)***				
OXYVen	- 4.119 (1.206)***				

Tabla 10 (cont.) Parámetros estandarizados					
Grupos experimentales	Glutation reducido	TAC	Log (Actividad catalasa)	Proteínas carboniladas	Log (Proteínas modificadas por MDA)
VR	-2.825	-1.173	-2.239	1.554	0.324
	-3.116	-1.982	-2.995	1.034	2.622
	-3.550	-1.127	-3.751	-0.581	-0.147
	-3.517	-1.592	-4.624	-0.503	-1.326
	-3.151	-1.598	-3.693	-1.510	-0.736
	-2.034	-1.533	-2.937	-0.459	-2.622
	-1.803	-1.815	-2.181	1.985	0.206
	-1.726	-1.549	-3.054	3.910	0.560
ANTIOX	- 2.482 (0.470) ^{***} ,+++				
OXY	0.269 (1.436) ns,+++				
OxyVen	- 2..751 (1.295) ^{***}				

ANTIOX, OXY y OxyVen están expresados como media (desviación estándar); ns es diferencia estadística no significativa;

*** Comparación respecto al grupo control ($p < 0.001$); +++ comparación de VP y VR ($p < 0.001$).

DISCUSSION

1. INSUFICIENCIA VENOSA CRÓNICA Y ESTRÉS OXIDATIVO.

La etiología de la IVC está asociada con una incompetencia valvular y dilatación venosa, lo que se acompaña de estancamiento sanguíneo e hipoxia. A su vez, el propio estado de isquemia y la reducción de pH que se produce como resultado de la acumulación de sangre y la hipertensión venosa, causa la secreción de cantidades importantes de ROS y citoquinas pro-inflamatorias. Esta situación se asocia al incremento del estrés oxidativo, como demuestran diversos estudios en pacientes con IVC (Glowinski and Glowinski, 2002, Bergan, 2007, Karatepe et al., 2010). El exceso de ROS puede proceder, por una parte, del propio endotelio alterado por las condiciones de hipoxia e hipertensión venosa (Glowinski and Glowinski, 2002). Además del endotelio, la adventicia de las venas varicosas también parece ser una fuente importante de radicales libres ya que es rica en *vasa vasorum*, fibroblastos y células inflamatorias, algunas de las cuales son productoras de ROS (Glowinski and Glowinski, 2002, Bergan, 2007). Asimismo, recientemente se ha encontrado que en estadios avanzados de IVC, las válvulas venosas también presentan daño oxidativo, aumentando el estancamiento de la sangre y posiblemente contribuyendo a la incompetencia valvular (Karatepe et al., 2010). Por lo tanto, el daño a la pared venosa y a las válvulas crea una situación de retroalimentación positiva que mantiene elevados los niveles de estrés oxidativo en las venas varicosas.

2. DISEÑO DE BIOMARCADORES PLASMÁTICOS DE ESTRÉS EN IVC

El hallazgo de estrés oxidativo en diversas patologías ha planteado el uso de biomarcadores para la implementación de nuevas estrategias terapéuticas, de diagnóstico y de prevención. Dado que está claramente documentado en la literatura que en varices de pacientes con IVC se encuentra elevado el estrés oxidativo, sería de utilidad el desarrollo de biomarcadores. Éstos pueden ser obtenidos del análisis discreto de daño/estrés oxidativo/nitrosativo de tejidos y fluidos biológicos. Evidentemente, desde el punto de vista clínico la detección

en fluidos es la más adecuada. En concreto, la utilización del plasma para la detección de biomarcadores es adecuada ya que la sangre es un tejido de fácil obtención, lo que permitiría estudiar la progresión de la enfermedad y, diseñando el protocolo adecuado, la posibilidad de predecir si el paciente va a presentar recidiva.

No existen apenas datos de los niveles de estrés oxidativo en el plasma de pacientes con IVC. Sin embargo, dada la consistencia en la literatura de la presencia de ROS elevados el tejido varicoso, se puede esperar que estos niveles se encuentren también aumentados en el plasma de estos pacientes. En este sentido, la sangre o el plasma obtenido a partir de la misma, podría utilizarse para obtener información sobre el estatus oxidativo de un individuo con IVC. La muestra reflejaría el total de los radicales libres producidos por el tejido dañado -que pueden difundir hacia el torrente sanguíneo- y los producidos por las células sanguíneas -tales como las leucocitos, plaquetas, etc, que también se encuentran activadas en patología venosa y contribuyen a la producción de ROS - (Veskoukis et al., 2009, Nikolaidis and Jamurtas, 2009).

Los datos de biomarcadores plasmáticos de estrés oxidativo en IVC son escasos y controvertidos, encontrándose tanto aumentos como disminuciones o sin cambios entre pacientes con IVC y controles (Flore et al., 2003, Yasim et al., 2008). Esta controversia se debe a la complejidad de los mecanismos implicados en el estrés oxidativo y a su naturaleza multifactorial (Veglia et al., 2010). Por ello, es necesario valorar un conjunto de marcadores biológicos plasmáticos que reflejen fielmente el estado redox del individuo con IVC (Veskoukis et al., 2009).

Para el diseño de un protocolo que permita predecir el diagnóstico o la progresión de una enfermedad basándose en biomarcadores, es necesario que su detección sea sencilla, de manera que pueda llevarse a la práctica rutinaria del laboratorio en clínica. Para la detección directa de algunos ROS/RNS *in vitro* es necesario utilizar técnicas muy complejas como resonancia electrón spin o HPLC, entre otros, métodos que no son aplicables en estudios clínicos debido a la inestabilidad de las especies reactivas (corta vida media, segundos)

y a la necesidad de equipos sofisticados y caros. Debido a que los productos de la reacción de los ROS/RNS con biomoléculas son más estables que los propios ROS/RNS, muchos de estos metabolitos estables y/o la concentración de productos diana de oxidación son más adecuados como biomarcadores oxidativos.

De lo anteriormente descrito podemos resumir que en el diseño de un protocolo para medir en clínica el nivel de estrés oxidativo en una patología -en este caso la IVC- se deben de seguir los siguientes pasos:

- 1) detectar cuales son los biomarcadores que se modifican significativamente en dicha patología

- 2) utilizar sólo aquellos que se midan de forma sencilla.

Basado en la carencia de información fiable del estado de estrés oxidativo plasmático en IVC y en la necesidad de contar con biomarcadores de diagnóstico temprano de la patología, el primer objetivo principal de la presente Tesis Doctoral ha sido la evaluación de marcadores plasmáticos relacionados con el estrés oxidativo en pacientes con IVC, teniendo en cuenta tanto la formación de ROS, como los sistemas de defensa antioxidantes.

Se han propuesto numerosos indicadores para medir el estado prooxidante o antioxidante en diversas patologías, pero ningún de ellos puede ser considerado como un estándar “*gold standard*” para medir el estrés oxidativo o cambios en el estado oxidativo de un paciente. Los estudios basados en la medida individual de estos indicadores arrojan resultados conflictivos, dado que sólo describen parcialmente el estado oxidativo de un individuo y suelen mostrar alta variabilidad entre sujetos e incluso, en un mismo sujeto a lo largo del tiempo (Veglia et al., 2006, Veglia et al., 2009a, Veglia et al., 2009b). Debido a ello, recientemente se ha propuesto el uso de un indicador integral que tiene en cuenta la naturaleza multifactorial del estrés oxidativo, que se ha denominado OXY-SCORE. El OXY-SCORE se ha calculado tomando en cuenta medidas tanto del daño oxidativo como del sistema de defensa antioxidante (Veglia et al., 2010).

En la presente Tesis Doctoral, una vez encontrados los biomarcadores discriminantes de la patología venosa, se ha desarrollado un indicador global de estrés oxidativo, que hemos denominado OXYVen. Para diseñar este indicador global, se han valorado sistemáticamente en los plasmas de los individuos incluidos en el estudio, biomarcadores relevantes relacionados con la destrucción, síntesis o daño producido por ROS.

Se ha demostrado que el estrés oxidativo está en el origen y desarrollo de numerosas patologías, tales como la obesidad, la hipertensión o la Diabetes Melitus, todas ellas asociadas al denominado síndrome metabólico, muy prevalente en la población (Whaley-Connell et al., 2011). Por lo tanto, en el presente estudio se ha tenido especial cuidado en la historia clínica de los pacientes, con objeto de excluir a aquellos que presentan estas patologías. Asimismo, se ha decidido estudiar pacientes con IVC homogéneos en su clasificación CEAP (mayoritariamente de grado 2), con objeto de determinar si, en estos estadios tempranos de la enfermedad, los pacientes ya presentan alteraciones plasmáticas en el estrés oxidativo. De ser así, se podría diseñar un protocolo que permitiera predecir la IVC antes de la aparición de síntomas clínicos de la patología venosa. Por otra parte, considerando que la recidiva de varices es un problema relevante en esta patología (Badri and Bhattacharya, 2008), se han estudiado los biomarcadores propuestos también en pacientes con varices recidivantes, para determinar si es posible predecir la evolución de la enfermedad mediante los indicadores parciales OXY y ANTIOX o el indicador de estrés oxidativo global OXYVen.

3. CUANTIFICACIÓN DEL INDICADOR GLOBAL DE ESTRÉS OXIDATIVO OXYyVEN

Para la cuantificación del indicador global del nivel de estrés oxidativo plasmático (OXYVen) se han tenido en cuenta los indicadores parciales de protección antioxidante (ANTIOX) y de daño oxidativo global (OXY).

En cuanto al ANTIOX, los sistemas de defensa antioxidante cuantificados han sido:

1) Los sistemas no enzimáticos: glutatión, ácido úrico y la capacidad antioxidante no enzimática total.

2) La actividad catalasa.

De éstos, sólo aquellos que presentaron diferencias significativas entre los grupos experimentales han sido incluidos en el cálculo del indicador parcial ANTIOX.

En relación con el otro indicador parcial, OXY, se ha cuantificado el daño oxidativo a proteínas estudiando:

1) Las proteínas carboniladas

2) Las proteínas modificadas por MDA

3) Los productos avanzados de oxidación de proteínas (AOPPs).

Asimismo, se ha evaluado la actividad de las enzimas productoras de radicales libres descritas en patología venosa y que pudieran estar presentes en el plasma:

1) Mieloperoxidasa

2) Xantina oxidasa.

Al igual que en el caso anterior, para el cálculo del indicador OXY sólo fueron tomados en cuenta aquellos parámetros que mostraron diferencia estadística entre los grupos experimentales, es decir, aquellos biomarcadores discriminantes.

Los resultados del cálculo de estos indicadores demuestran que el plasma de pacientes con varices primarias presenta un valor mayor del indicador de daño oxidativo OXY y un valor menor del indicador de protección antioxidante ANTIOX, en comparación con los sujetos control. En consecuencia, estos datos dan un valor de OXYVen (estrés oxidativo global) significativamente mayor en los pacientes con IVC en comparación con sujetos sanos. En la figura 26 se

muestra un esquema representativo de estas diferencias en los indicadores calculados.

Por otra parte, los pacientes con varices primarias presentan un valor de OXY significativamente mayor que el encontrado en várices recidivantes— lo que representa un mayor nivel de estrés oxidativo- (Figura 26). Este hecho se puede explicar teniendo en cuenta que durante la cirugía primaria se extirpa la vena safena, que representa una cantidad mucho mayor de tejido dañado (productores de radicales libres que pueden pasar al plasma), en comparación con la cantidad de tejido varicoso formado durante la recidiva (Flore et al., 2003). Esto también explicaría que el sistema de defensa esté más elevado - como mecanismo de compensación- en los pacientes con várices primarias en comparación con los pacientes de várices recidivantes. Esto se pone de manifiesto por el mayor valor de ANTIOX (valores absolutos de la Tabla 10) en el plasma de pacientes con varices primarias y que está representado esquemáticamente en la Figura 26.

En conjunto estos datos indican que es posible poner de manifiesto en el plasma de pacientes con insuficiencia venosa el estrés oxidativo que se ha descrito en el propio tejido varicoso (Glowinski and Glowinski, 2002, Bergan, 2007). El hecho de que estas diferencias en los indicadores parciales (OXY y ANTIOX) y global (OXYVen) sean detectables en estadios tempranos de la patología venosa, como es el nivel CEAP 2, sugiere que estos indicadores podrían ser de utilidad para el diagnóstico temprano de la insuficiencia venosa.

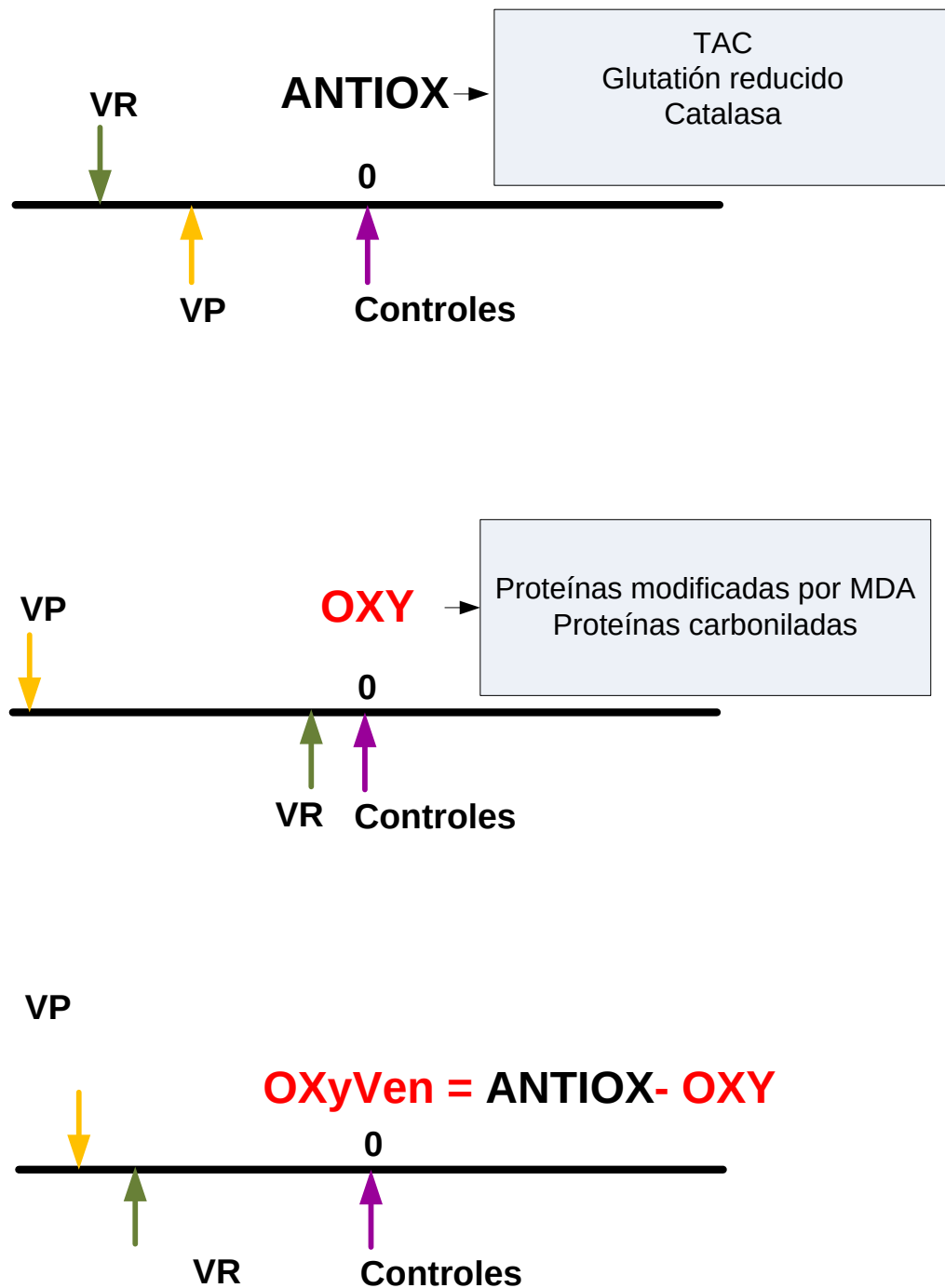


Figura 26. Esquema representativo de los indicadores parciales (OXY y ANTIOX) e indicador global (OXyVen) en los tres grupos experimentales. En

los recuadros se indican los parámetros incluidos para su cálculo. VP, varices primarias, VR, varices recidivantes.

4. ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS RELACIONADOS CON LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE NO ENZIMÁTICA.

La capacidad antioxidante plasmática no enzimática total puede ser determinada mediante diferentes métodos (Bartosz, 2010). Entre ellos cabe destacar el método ORAC como el de mayor uso en muestras biológicas. En el ensayo ORAC la capacidad antioxidante de una molécula particular depende en gran medida de la sonda de detección utilizada. Por ejemplo, un antioxidante como el ácido ascórbico presenta distinta capacidad antioxidante dependiendo de si es evaluado usando como sonda la fluoresceína o el rojo de pirogallol (Niki, 2010). Asimismo, se ha demostrado que si se usa fluoresceína la capacidad antioxidante de detección de ácido úrico es 400 veces mayor que si se usa el rojo de pirogallol. Por otra parte, la capacidad de detectar glutatión reducido mediante fluoresceína es aproximadamente 10 veces menor (Torres et al., 2008). Esto indica que la fluoresceína, sonda utilizada en nuestro estudio, es más sensible para reflejar indirectamente los niveles de ácido úrico que los niveles de glutatión reducido en las muestras de plasma.

El ácido úrico representa aproximadamente el 70% de los antioxidantes no enzimáticos de bajo peso molecular presentes en el plasma (Vassalle et al., 2004), por lo tanto, el método ORAC reflejaría si existen diferencias en los niveles plasmáticos de ácido úrico entre los grupos experimentales estudiados. En el presente estudio observamos que no existe diferencia entre los tres grupos experimentales, tanto en la cinética de protección de la sonda de fluoresceína, así como en los valores ORAC. Esto se confirma con los datos de medida directa de ácido úrico plasmático, que son similares en los tres grupos experimentales.

La presencia de antioxidantes plasmáticos no enzimáticos se ha medido también mediante el método TAC, más sensible que el ORAC, que se basa en la inhibición de la luminiscencia generada por el luminol en presencia de

antioxidantes de bajo peso molecular. Este método ha sido aplicado con éxito a distintas muestras biológicas, incluido el plasma (Saleh and Plieth, 2010). La sensibilidad de esta metodología está demostrada por la necesidad de diluir casi 400 veces las muestras, por lo que su aplicación al presente estudio permite detectar pequeñas diferencias en antioxidantes no predominantes en el plasma. Nuestros resultados de TAC indican que no hay diferencias entre el plasma de sujetos controles y el de pacientes con varices primarias, pero sí se detectó una menor capacidad antioxidante en pacientes con varices recidivantes. Este hecho podría guardar relación con la inducción de los sistemas de defensa antioxidante del paciente con varices primarias como mecanismo compensatorio a la gran producción de ROS, como se ha explicado anteriormente. Sin embargo, esta situación no se produce en pacientes con varices recidivantes, ya en éstos la cantidad de tejido varicoso es mucho menor (Flore et al., 2003). La hipótesis anterior estaría corroborada por los datos de glutatión reducido (GSH), que indican que no existe diferencia significativa entre el plasma del grupo control y el de pacientes con varices primarias, mientras que sí se observa una disminución de GSH en el plasma de pacientes con varices recidivantes en comparación con las primarias.

Los datos anteriores sugieren que en los pacientes con varices primarias uno de los mecanismos de defensa que se inducen es la síntesis de glutatión reducido. El GSH es un potente agente reductor que participa en diversas rutas metabólicas antioxidantes, actuando tanto como donador de protones o como cofactor. Por una parte, el GSH actúa intracelularmente como *scavenger* de diversos ROS, tal como radicales anión superóxido e hidroxilo y también puede detoxificar células de algunos RNS como el radical peroxinitrito. Además de sus acciones directas eliminando ROS y RNS, el GSH actúa como cofactor en varios sistemas enzimáticos antioxidantes, como la dehidroascorbato reductasa, que participa en la regeneración del ascorbato, otro antioxidante importante (Franco et al., 2007) y también regula el estado redox de proteínas (Jones, 2006). En situaciones de estrés oxidativo el GSH es consumido aumentando el nivel de glutatión oxidado (GSSG) y por lo tanto disminuye la

razón [GSH/GSSG]. Recientemente se ha propuesto que este parámetro es un indicador fiable del estrés oxidativo global en un sistema biológico (Jones, 2006).

El GSH también puede encontrarse en el plasma, lo cual indica que cumple una función antioxidante no sólo intracelular, sino también como protector de proteínas plasmáticas. En los pacientes con varices recidivantes observamos una disminución del GSH, como se ha descrito previamente en otras situaciones patológicas como la diabetes Mellitus, la hipercolesterolemia y la obesidad (Go and Jones, 2011).

5. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LA CATALASA PLASMÁTICA.

A pesar de no encontrar diferencias en la capacidad antioxidante total no enzimática en el plasma de pacientes con varices primarias, si se observó una disminución de la actividad catalasa, enzima encargada de la destrucción del peróxido de hidrógeno, el cual se genera por dismutación de radical anión superóxido en condiciones fisiológicas.

El papel catabólico de la catalasa está restringido al H_2O_2 exógeno (Johnson et al., 2010) y puede ser liberada al plasma por células inmunitarias (Berzosa et al., 2011). En la patología venosa existe infiltración de células en la pared (Traub and Berk, 1998, Berk et al., 2001, Hsiai et al., 2001, Passerini et al., 2003) que secretan al plasma importantes cantidades de ROS (Michiels et al., 2002, Naoum et al., 2007). Es de esperar que como respuesta a este incremento del estrés oxidativo en el propio plasma, se induzca la expresión y secreción de la catalasa por células inmunitarias circulantes. A pesar de existir un aumento en la expresión de la enzima como mecanismo compensatorio en la patología varicosa, esta catalasa secretada se encontraría ante un entorno oxidante, que podría inactivarla. Por ejemplo, podría ser inhibida por el peroxinitrito generado por la reacción entre el radical anión superóxido – presente en elevadas concentraciones- y el NO^* endotelial, como se ha descrito anteriormente (Gebicka and Didik, 2009). Esta inhibición explicaría nuestros resultados que muestran que la actividad de la catalasa está disminuida significativamente en el plasma de pacientes con IVC.

6. ESTUDIO DE BIOMARCADORES DE DAÑO A PROTEÍNAS.

El MDA es un aldehído que se produce en elevadas cantidades durante la peroxidación de lípidos, los cuales reaccionan con las proteínas plasmáticas produciendo su oxidación. Por tanto, los niveles de MDA representan una medida del daño oxidativo a proteínas. Algunos estudios indican que el balance oxidativo/antioxidante está alterado en la pared de venas varicosas, debido fundamentalmente a productos de la peroxidación lipídica. Esto se ha observado particularmente después de una tromboflebitis superficial (Glowinski and Glowinski, 2002). Asimismo, los niveles de MDA también están elevados en las válvulas en estadios avanzados la IVC (Karatepe et al., 2010). Los resultados del presente estudio indican que los niveles de proteínas plasmáticas modificadas por MDA están elevados en pacientes con varices primarias en estadios tempranos de la patología (CEAP 2), lo cual indicaría que el daño oxidativo es un evento temprano en la IVC y podría estar implicado en su etiología, y no sólo en su progresión. Otros estudios en pacientes con un grado similar de IVC al del presente estudio no han encontrado diferencias significativas en los niveles de MDA plasmático con respecto a sujetos control (Yasim et al., 2008). El MDA plasmático puede estar en forma libre o conjugada. Nosotros medimos la forma conjugada, que es la mayoritaria en plasma, a diferencia de Yasim y colaboradores, que miden la forma libre, lo que explica que nosotros hayamos detectado diferencias en los niveles de MDA entre plasma de pacientes con varices primarias y controles.

La reducción de los niveles de MDA en pacientes con varices recidivantes en relación con los encontrados en pacientes con varices primarias, se explicaría por la menor cantidad de tejido productor de ROS tras la cirugía primaria, como se ha indicado anteriormente.

Estos resultados del daño a proteínas medido por MDA, han sido confirmados por los niveles de proteínas carboniladas encontrados en el presente estudio, que están relacionados con otros aldehídos producidos por la peroxidación lipídica además del MDA (Esterbauer et al., 1991).

Las proteínas, además de oxidarse por la acción de la peroxidación lipídica, son susceptibles de oxidarse también por el ataque directo de ROS. Se ha descrito que los productos avanzados de oxidación de proteínas (AOPPs) reflejan el daño oxidativo global a proteínas (Witko-Sarsat et al., 1996), pero no están correlacionados con los niveles de MDA. El hecho de que los resultados de MDA y proteínas carboniladas, pero no los de AOPPs, sean mayores en pacientes con varices en relación con los sujetos controles, indicaría que el daño oxidativo en IVC está relacionado con la peroxidación lipídica.

7. Estudio de enzimas productoras de radicales libres y especies oxidantes.

La mieloperoxidasa (MPO) es una enzima que cataliza la producción de ácido hipocloroso (Henderson et al., 2003) y que se expresa en neutrófilos y monocitos. Se ha descrito que la MPO se encuentra incrementada en venas varicosas (Glowinski and Glowinski, 2002). Nuestros resultados indican que no hay diferencias significativas en la actividad MPO entre el grupo control y el plasma de pacientes con IVC, como tampoco en los niveles de AOPPs, los cuales están asociados con la concentración de ácido hipocloroso (Witko-Sarsat et al., 1996). Además, nuestros resultados de actividad plasmática de MPO concuerdan con los niveles de expresión de esta enzima en pacientes con varices en estadíos CEAP 3-4. Se ha sugerido que esto se debe a que la MPO liberada al plasma requiere de altos niveles de activación de los leucocitos, como los descritos en estadíos muy avanzados de la IVC (Jacob et al., 2002). Esto sugiere que la actividad MPO plasmática no es un buen biomarcador temprano de la IVC.

La xantina oxidasa es otra enzima productora de ROS que está elevada en la pared de venas varicosas, fundamentalmente en los segmentos que presentan tromboflebitis superficial. Esto sugiere que esta enzima se activa por hipoxia (Glowinski and Glowinski, 2002). Nuestros datos de actividad de la xantina oxidasa plasmática indican que ésta no es diferente entre los distintos grupos experimentales. Este hecho puede tener dos explicaciones, o bien, a

pesar el aumento de la expresión descrito en venas varicosas (Glowinski and Glowinski, 2002) no hay un aumento paralelo de actividad, o bien la xantina oxidasa no es secretada al plasma y por tanto no es un biomarcador plasmático adecuado a la patología varicosa, al menos en estadios tempranos.

8. METALOPROTEINASAS PLASMÁTICAS

Las MMPs se encuentran habitualmente sobre-expresadas en tejido varicoso y también muestran una elevada actividad en el plasma de pacientes con IVC. Esto se ha descrito específicamente para la MMP-9, sin apenas mostrar cambios la actividad MMP-2 (Jacob et al., 2002). Por lo tanto, nuestro objetivo fue determinar si en muestras de pacientes con varices recidivantes también encontrábamos diferencias en la actividad de estas enzimas. Nuestros datos indican que en estadios tempranos de la IVC ya existe una menor actividad de la MMP-9, pero no de la MMP-2, en varices recidivantes en comparación con las primarias. La activación de MMPs es dependiente de los niveles de ROS, siendo particularmente sensible la MMP-9 (Jian Liu and Rosenberg, 2005), hecho que explica que sólo encontremos diferencias en la actividad de esta enzima en estadios CEAP 2 en plasma de pacientes con varices primarias, en los que hay mayor producción de ROS, en comparación con los pacientes con varices recidivantes.

Entre los ROS que activan la MMP-9 se ha descrito el ácido hipocloroso y el peroxinitrito (Jian Liu and Rosenberg, 2005). Nuestros datos de MPO indican que el ácido hipocloroso no juegue un papel relevante. Sin embargo, es posible inferir que los niveles de peroxinitrito plasmático estén elevados en pacientes con IVC, como indicarían los datos de actividad de MMP-9 y catalasa, enzima que es inactivada también por peroxinitrito (Gebicka and Didik, 2009)

El peroxinitrito es producto de la reacción entre el NO^* y el anión superóxido, siendo la NADPH oxidasa vascular, la principal fuente de este último. Esta enzima se induce por la hipoxia (Rathore et al., 2008), que es una de las características de la pared de las venas varicosas debida al estancamiento sanguíneo. La NADPH oxidasa es una proteína de membrana y

por lo tanto no puede ser medida en plasma. Dado que no hemos encontrado diferencias en la actividad del otros sistema generadores de radical anión superóxido, como la xantina oxidasa, es plausible que la NADPH oxidasa esté elevada en la pared de las venas varicosas y sea la responsable de la producción del radical primario, anión superóxido (Valko et al., 2007). Estos datos podrían ser confirmados evaluando la actividad enzimática en el tejido varicoso.

9. LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y PERSPECTIVAS FUTURAS.

El presente trabajo ha estudiado en el plasma de pacientes con insuficiencia venosa crónica, en estadíos tempranos de la enfermedad (CEAP 2-3), si ya existen alteraciones de algunos parámetros relevantes relacionados con el estrés oxidativo. Para ello se ha tenido en cuenta la naturaleza multifactorial del estrés oxidativo y por tanto se han estudiado diversos sistemas de producción de ROS y de defensa antioxidante. No se ha realizado una evaluación exhaustiva de todos los parámetros plasmáticos, sino sólo de aquellos relevantes y cuya medida pueda ser abordada sistemáticamente sin demasiada dificultad técnica en un laboratorio de análisis clínicos. De todos ellos sólo se han incluido en el indicador global OXYVen aquellos parámetros que difieren estadísticamente entre pacientes y controles sanos.

Los resultados del indicador OXYVen muestran que ya en estadíos iniciales de la IVC existe una importante elevación del estrés oxidativo global. Estos datos abren importantes perspectivas futuras de diagnóstico. La primera de ellas sería la detección precoz de la patología en grupos de riesgo, incluso antes de la aparición de síntomas clínicos, mediante la evaluación de su nivel global de estrés oxidativo específico. Asimismo, sería posible distinguir entre pacientes que presenten deficiencias en sus sistemas de defensa –que presentarían un valor del indicador parcial ANTIOX alejado del control- y aquellos que tengan elevados sus niveles de producción de ROS -que presentarían un valor del indicador parcial OXY alejado del control.

Para validar y estandarizar en la práctica clínica los indicadores OXY, ANTIOX y el global OXYVen, sería necesaria la realización de un futuro estudio epidemiológico. Una vez realizadas estas validaciones, estos indicadores no sólo servirían como marcadores de la enfermedad, sino también para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Hoy en día los tratamientos farmacológicos de la IVC no son muy eficaces, pero es interesante resaltar que los venotónicos utilizados hasta la fecha tienen, en su mayoría propiedades antioxidantes. Es pues posible, que la detección precoz de qué tipo de alteración presenta un paciente permitiera la prescripción de determinados fármacos específico, que estimulen sus defensa antioxidantes o que sean *escavenger* de radicales libres.

El indicador global OXYVen no muestra diferencias entre pacientes con varices primarias y recidivas, pero si el indicador parcial ANTIOX. Esto significa que es necesario un desarrollo posterior de esta metodología para la detección de pacientes con alta probabilidad de recidiva. Para ello se necesitaría realizar otro ensayo de seguimiento a lo largo del tiempo de los indicadores más adecuados en un grupo de pacientes que sean sometidos a cirugía primaria.

En conjunto, el desarrollo de los indicadores de estrés oxidativo propuestos en esta Tesis Doctoral tendría gran importancia desde el punto de vista asistencial, ya que permitiría determina qué subgrupo de pacientes precisa un seguimiento clínico para el control de la enfermedad, evitando la frecuentación asistencial innecesaria así como el consecuente coste socioeconómico.

CONCLUSIONES

A continuación se describen las conclusiones que podemos extraer de la siguiente Tesis en relación con los resultados más relevantes.

CONCLUSIONES ESPECÍFICAS

1. La capacidad antioxidante medida mediante TAC y los niveles de glutatión reducido, son mayores en plasma de pacientes con varices primarias que el de los pacientes con varices recidivantes. Esto podría guardar relación con la inducción de los sistemas de defensa antioxidante del paciente como mecanismo compensatorio a la mayor cantidad de tejido productor de ROS antes de la cirugía primaria.
2. No existen diferencias en los niveles de ácido úrico reducido entre los tres grupos experimentales, lo que significa que el ácido úrico no es un buen biomarcador en los estadios iniciales de insuficiencia venosa crónica.
3. La actividad de la catalasa está disminuida en el plasma de pacientes con varices primarias en comparación con el de sujetos control lo que sugieren que en insuficiencia venosa crónica hay un aumento de ROS.
4. En el plasma de pacientes con varices primarias están aumentados los niveles de proteínas modificadas por MDA y de proteínas carboniladas, lo que significa que el daño a proteínas en la patología venosa está relacionado con la peroxidación lipídica.
5. No se encuentran alteraciones en los niveles de productos avanzados de oxidación (AOPPs) ni en la actividad mieloperoxidasa del plasma de pacientes con varices primarias, o recidivantes, lo que significa que el daño a proteínas plasmáticas en estadios tempranos de la patología venosa no está relacionada con el ácido hipocloroso.
6. La reducción de los niveles de daño a proteínas en el plasma de pacientes con varices recidivantes en comparación con el de varices

primarias puede ser deberse a la menor proporción de tejido productor de ROS tras la cirugía primaria.

7. No se encuentran diferencias en las actividades mieloperoxidasa o xantina oxidasa del plasma de pacientes con varices primarias o recidivantes, lo que indica estas enzimas no servirían como biomarcadores en estadios tempranos de la insuficiencia venosa crónica.
8. Los niveles de MMP-9 se encuentran más elevados el plasma de pacientes con varices primarias en comparación con el plasma de pacientes con recidiva, hecho que se explica por la reducción de los niveles de ROS tras la cirugía primaria.
9. El indicador global OXYVen es un buen indicador de estrés oxidativo en estadios tempranos de la insuficiencia venosa crónica y la elevada significancia estadística detectada entre los sujetos control y los pacientes con varices primarias permite prever que puede servir como predictor en estadios muy iniciales de la enfermedad.

CONCLUSIONES GENERALES.

1. En estadios tempranos de la patología venosa existe estrés oxidativo detectable en el plasma mediante el uso de biomarcadores.
2. La inclusión de estos biomarcadores individuales en el indicador global de estrés oxidativo OXYVen permite establecer diferencias altamente significativas entre pacientes con insuficiencia venosa y controles sanos.
3. Existen diferencias en el indicador parcial de defensa antioxidante ANTIOX entre pacientes con varices primarias y recidivas.

REFERENCIAS

- ABDUL-HUSSIEN, H., HANEMAAIJER, R., VERHEIJEN, J. H., VAN BOCKEL, J. H., GEELKERKEN, R. H. & LINDEMAN, J. H. (2009) Doxycycline therapy for abdominal aneurysm: Improved proteolytic balance through reduced neutrophil content. *J Vasc Surg*, 49, 741-9.
- AHMAD, S. & EVANS, W. H. (2002) Post-translational integration and oligomerization of connexin 26 in plasma membranes and evidence of formation of membrane pores: implications for the assembly of gap junctions. *Biochem J*, 365, 693-9.
- AIKENS, J. & DIX, T. A. (1991) Perhydroxyl radical (HOO.) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides. *J Biol Chem*, 266, 15091-8.
- ASARD, H. (2002) Ascorbate. In: Banerjee. R., ed. *Redox Biochemistry*. Hoboken:, A John Wiley & Son, Inc 2008, 22-27.
- AUNAPUU, M. & AREND, A. (2005) Histopathological changes and expression of adhesion molecules and laminin in varicose veins. *Vasa*, 34, 170-5.
- BABIOR, B. M., LAMBETH, J. D. & NAUSEEF, W. (2002) The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys*, 397, 342-4.
- BADRI, H. & BHATTACHARYA, V. (2008) A review of current treatment strategies for varicose veins. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*, 3, 126-36.
- BALLATORI, N., KRANCE, S. M., NOTENBOOM, S., SHI, S., TIEU, K. & HAMMOND, C. L. (2009) Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem*, 390, 191-214.
- BARTOSZ, G. (2010) Non-enzymatic antioxidant capacity assays: Limitations of use in biomedicine. *Free Radic Res*, 44, 711-20.
- BERGAN, J. (2007) Molecular mechanisms in chronic venous insufficiency. *Ann Vasc Surg*, 21, 260-6.
- BERGENDI, L., BENES, L., DURACKOVA, Z. & FERENCIK, M. (1999) Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci*, 65, 1865-74.

- BERK, B. C., ABE, J. I., MIN, W., SURAPISITCHAT, J. & YAN, C. (2001) Endothelial atheroprotective and anti-inflammatory mechanisms. *Ann N Y Acad Sci*, 947, 93-109; discussion 109-11.
- BERZOSA, C., CEBRIAN, I., FUENTES-BROTO, L., GOMEZ-TRULLEN, E., PIEDRAFITA, E., MARTINEZ-BALLARIN, E., LOPEZ-PINGARRON, L., REITER, R. J. & GARCIA, J. J. (2011) Acute exercise increases plasma total antioxidant status and antioxidant enzyme activities in untrained men. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 540458.
- BEYER, W. F., JR. & FRIDOVICH, I. (1987) Effect of hydrogen peroxide on the iron-containing superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 26, 1251-7.
- BJORNSTEDT, M., XUE, J., HUANG, W., AKESSON, B. & HOLMGREN, A. (1994) The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. *J Biol Chem*, 269, 29382-4.
- BLOMGREN, L., JOHANSSON, G., DAHLBERG-AKERMAN, A., THERMAENIUS, P. & BERGQVIST, D. (2005) Changes in superficial and perforating vein reflux after varicose vein surgery. *J Vasc Surg*, 42, 315-20.
- BONOMINI, F., TENGATTINI, S., FABIANO, A., BIANCHI, R. & REZZANI, R. (2008) Atherosclerosis and oxidative stress. *Histol Histopathol*, 23, 381-90.
- BRADBURY, A. W., STONEBRIDGE, P. A., RUCKLEY, C. V. & BEGGS, I. (1993) Recurrent varicose veins: correlation between preoperative clinical and hand-held Doppler ultrasonographic examination, and anatomical findings at surgery. *Br J Surg*, 80, 849-51.
- BRADBURY, A., EVANS, C., ALLAN, P., LEE, A., RUCKLEY, C. V. & FOWKES, F. G. (1999) What are the symptoms of varicose veins? Edinburgh vein study cross sectional population survey. *BMJ*, 318, 353-6.
- BRIGELIUS-FLOHE, R. (1999) Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med*, 27, 951-65.

- CADENAS, E. & SIES, H. (1998) The lag phase. *Free Radic Res*, 28, 601-9.
- CADENAS, E. (1997) Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors*, 6, 391-7.
- CAI, H. & HARRISON, D. G. (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*, 87, 840-4.
- CALLEJAS, J. M. & MANASANCH, J. (2004) Epidemiology of chronic venous insufficiency of the lower limbs in the primary care setting. *Int Angiol*, 23, 154-63.
- CANALI, R., COMITATO, R., SCHONLAU, F. & VIRGILI, F. (2009) The anti-inflammatory pharmacology of Pycnogenol in humans involves COX-2 and 5-LOX mRNA expression in leukocytes. *Int Immunopharmacol*, 9, 1145-9.
- CARPENTIER, P. H., MARICQ, H. R., BIRO, C., PONCOT-MAKINEN, C. O. & FRANCO, A. (2004) Prevalence, risk factors, and clinical patterns of chronic venous disorders of lower limbs: a population-based study in France. *J Vasc Surg*, 40, 650-9.
- CARR, A. C., MCCALL, M. R. & FREI, B. (2000) Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20, 1716-23.
- CATHCART, M. K. (2004) Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages: contributions to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24, 23-8.
- CIUFFETTI, G., LOMBARDINI, R., PASQUALINI, L., VAUDO, G. & LUPATTELLI, G. (1999) Circulating leucocyte adhesion molecules in chronic venous insufficiency. *Vasa*, 28, 156-9.
- CONDEZO-HOYOS, L., ABDERRAHIM, F., CONDE, M. V., SUSÍN, C., DÍAZ-GIL, J. J., GONZÁLEZ, M. C. & ARRIBAS, S. M. (2009) Antioxidant activity of liver growth factor, a bilirubin covalently bound to albumin. *Free Radical Biology and Medicine*, 46, 656-662.

- CORCOS, L., DE ANNA, D., DINI, M., MACCHI, C., FERRARI, P. A. & DINI, S. (2000) Proximal long saphenous vein valves in primary venous insufficiency. *J Mal Vasc*, 25, 27-36.
- CORCOS, L., MACCHI, C., DE ANNA, D., PROCACCI, T., PERUZZI, G., GIANNELLI, F., GHERI, G. & BRIZZI, E. (1996a) The anatomical variables of the sapheno-popliteal junction visualization by radiological and echographic examinations. *Ital J Anat Embryol*, 101, 15-28.
- CORCOS, L., PROCACCI, T., PERUZZI, G., DINI, M. & DE ANNA, D. (1996b) Sapheno-femoral valves. Histopathological observations and diagnostic approach before surgery. *Dermatol Surg*, 22, 873-80.
- CRAPO, J. D., OURY, T., RABOUILLE, C., SLOT, J. W. & CHANG, L. Y. (1992) Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 10405-9.
- CRIQUI, M. H., JAMOSMOS, M., FRONEK, A., DENENBERG, J. O., LANGER, R. D., BERGAN, J. & GOLOMB, B. A. (2003) Chronic venous disease in an ethnically diverse population: the San Diego Population Study. *Am J Epidemiol*, 158, 448-56.
- DALLE-DONNE, I., ROSSI, R., COLOMBO, R., GIUSTARINI, D. & MILZANI, A. (2006) Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem*, 52, 601-23.
- DANIELSSON, G., EKLOF, B., GRANDINETTI, A. & KISTNER, R. L. (2002) The influence of obesity on chronic venous disease. *Vasc Endovascular Surg*, 36, 271-6.
- DARKE, S. G. & PENFOLD, C. (1992) Venous ulceration and saphenous ligation. *Eur J Vasc Surg*, 6, 4-9.
- DE GREY, A. D. (2002) HO₂*: the forgotten radical. *DNA Cell Biol*, 21, 251-7.
- DEISSEROTH, A. & DOUNCE, A. L. (1970) Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol Rev*, 50, 319-75.

- DWERRYHOUSE, S., DAVIES, B., HARRADINE, K. & EARNSHAW, J. J. (1999) Stripping the long saphenous vein reduces the rate of reoperation for recurrent varicose veins: five-year results of a randomized trial. *J Vasc Surg*, 29, 589-92.
- EGAN, B., DONNELLY, M., BRESNIHAN, M., TIERNEY, S. & FEELEY, M. (2006) Neovascularization: an "innocent bystander" in recurrent varicose veins. *J Vasc Surg*, 44, 1279-84; discussion 1284.
- EKLÖF, B. (2007) Classifying venous disease. In *The Vein book* Vein. Bergen J.J. Ed. Elsevier, Amsterdam.
- EL, W. Y., GIANNOUKAS, A. D., GULLIFORD, C. J., SUVARNA, S. K. & CHAN, P. (2004) Saphenofemoral venous channels associated with recurrent varicose veins are not neovascular. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 28, 590-4.
- ESTERBAUER, H. & CHEESEMAN, K. H. (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*, 186, 407-21.
- ESTERBAUER, H., SCHAUR, R. J. & ZOLLNER, H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*, 11, 81-128.
- EVANS, C. J., FOWKES, F. G., RUCKLEY, C. V. & LEE, A. J. (1999) Prevalence of varicose veins and chronic venous insufficiency in men and women in the general population: Edinburgh Vein Study. *J Epidemiol Community Health*, 53, 149-53.
- FLORE, R., SANTOLIVUO, A., ANTONIO, D. L., POLA, E., FLEX, A., POLA, R., MUZI, M. G., FARINON, A., RULLI, F., GAETANI, E., TONDI, P., GERARDINO, L. & GASBARRINI, A. (2003) Long saphenous vein stripping reduces local level of reactive oxygen metabolites in patients with varicose disease of the lower limbs. *World J Surg*, 27, 473-5.

- FOLZ, R. J. & CRAPO, J. D. (1994) Extracellular superoxide dismutase (SOD3): tissue-specific expression, genomic characterization, and computer-assisted sequence analysis of the human EC SOD gene. *Genomics*, 22, 162-71.
- FOWKES, F. G., EVANS, C. J. & LEE, A. J. (2001) Prevalence and risk factors of chronic venous insufficiency. *Angiology*, 52 Suppl 1, S5-15.
- FRANCO, R., SCHONEVELD, O. J., PAPPA, A. & PANAYIOTIDIS, M. I. (2007) The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases. *Arch Physiol Biochem*, 113, 234-58.
- FRIDOVICH, I. (1974) Superoxide dismutases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 41, 35-97.
- FRIDOVICH, I. (1975) Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem*, 44, 147-59.
- FUKAI, T., GALIS, Z. S., MENG, X. P., PARTHASARATHY, S. & HARRISON, D. G. (1998) Vascular expression of extracellular superoxide dismutase in atherosclerosis. *J Clin Invest*, 101, 2101-11.
- GEBICKA, L. & DIDIK, J. (2009) Catalytic scavenging of peroxynitrite by catalase. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103, 1375-1379.
- GLASS, G. M. (1988) Neovascularization in recurrence of varices of the great saphenous vein in the groin: phlebography. *Angiology*, 39, 577-82.
- GLOWINSKI, J. & GLOWINSKI, S. (2002) Generation of reactive oxygen metabolites by the varicose vein wall. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 23, 550-5.
- GO, Y.-M. & JONES, D. P. (2011) Cysteine/cystine redox signaling in cardiovascular disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 50, 495-509.
- GORECKI, M., BECK, Y., HARTMAN, J. R., FISCHER, M., WEISS, L., TOCHNER, Z., SLAVIN, S. & NIMROD, A. (1991) Recombinant human superoxide dismutases: production and potential therapeutical uses. *Free Radic Res Commun*, 12-13 Pt 1, 401-10.

- GOYAL, M. M. & BASAK, A. (2010) Human catalase: looking for complete identity. *Protein Cell*, 1, 888-97.
- GRIENDLING, K. K., SORESCU, D. & USHIO-FUKAI, M. (2000) NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*, 86, 494-501.
- GROUSSARD, C., RANNOU-BEKONO, F., MACHEFER, G., CHEVANNE, M., VINCENT, S., SERGENT, O., CILLARD, J. & GRATAS-DELAMARCHE, A. (2003) Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *Eur J Appl Physiol*, 89, 14-20.
- GRUNEWALD, R. A. (1993) Ascorbic acid in the brain. *Brain Res Brain Res Rev*, 18, 123-33.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. (1999) *Free radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, 3er ed.
- HANNA, I. R., HILENSKI, L. L., DIKALOVA, A., TANIYAMA, Y., DIKALOV, S., LYLE, A., QUINN, M. T., LASSEGUE, B. & GRIENDLING, K. K. (2004) Functional association of nox1 with p22phox in vascular smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med*, 37, 1542-9.
- HARRISON, R. (2002) Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med*, 33, 774-97.
- HAVIAROVA, Z., JANEGOVA, A., JANEGA, P., DURDIK, S., KOVAC, P., STVRTINOVA, V. & MRAZ, P. (2011) Nitric oxide synthases in varicose vein wall. *Bratisl Lek Listy*, 112, 18-23.
- HAWKES, S. P., LI, H. & TANIGUCHI, G. T. (2001) Zymography and reverse zymography for detecting MMPs, and TIMPs. *Methods Mol Biol*, 151, 399-410.
- HAWKINS, C. L., MORGAN, P. E. & DAVIES, M. J. (2009) Quantification of protein modification by oxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 46, 965-988.

- HENDERSON, J. P., BYUN, J., TAKESHITA, J. & HEINECKE, J. W. (2003) Phagocytes produce 5-chlorouracil and 5-bromouracil, two mutagenic products of myeloperoxidase, in human inflammatory tissue. *J Biol Chem*, 278, 23522-8.
- HISSIN, P. J. & HILF, R. (1976) Spectrofluorometric Measurement of Reduced Gluta. *Analytical Biochemistry*, 74, 214-226.
- HOBEIKA, M. J., THOMPSON, R. W., MUHS, B. E., BROOKS, P. C. & GAGNE, P. J. (2007) Matrix metalloproteinases in peripheral vascular disease. *J Vasc Surg*, 45, 849-57.
- HSIAI, T. K., CHO, S. K., REDDY, S., HAMA, S., NAVAB, M., DEMER, L. L., HONDA, H. M. & HO, C. M. (2001) Pulsatile flow regulates monocyte adhesion to oxidized lipid-induced endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21, 1770-6.
- IAFRATI, M. D., PARE, G. J., O'DONNELL, T. F. & ESTES, J. (2002) Is the nihilistic approach to surgical reduction of superficial and perforator vein incompetence for venous ulcer justified? *J Vasc Surg*, 36, 1167-74.
- IBORRA-ORTEGA E, BARJAU-URREA E, VILA-COLL E, BALLÓN-CARAZAS H, CAIROLS-CASTELLOTE M.A., /2006) Estudio comparativo de dos técnicas quirúrgicas en el tratamiento de las varices de las extremidades inferiores: resultados tras cinco años de seguimiento. *Angiología*; 58: 459-68.
- IWAI, S., NAKANISHI-UEDA, T., ARMSTRONG, D. & OGUCHI, K. (2008) Zymographical techniques for detection of matrix metalloproteinases. *Methods Mol Biol*, 477, 113-21.
- JACOB, M. P., CAZAUBON, M., SCEMAMA, A., PRIE, D., BLANCHET, F., GUILLIN, M. C. & MICHEL, J. B. (2002) Plasma matrix metalloproteinase-9 as a marker of blood stasis in varicose veins. *Circulation*, 106, 535-8.
- JIAN LIU, K. & ROSENBERG, G. A. (2005) Matrix metalloproteinases and free radicals in cerebral ischemia. *Free Radical Biology and Medicine*, 39, 71-80.

- JOHNSON, R. M., HO, Y. S., YU, D. Y., KUYPERS, F. A., RAVINDRANATH, Y. & GOYETTE, G. W. (2010) The effects of disruption of genes for peroxiredoxin-2, glutathione peroxidase-1, and catalase on erythrocyte oxidative metabolism. *Free Radic Biol Med*, 48, 519-25.
- JONES, D. P. (2006) Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, 8, 1865-79.
- JONES, D. P., CARLSON, J. L., MODY, V. C., CAI, J., LYNN, M. J. & STERNBERG, P. (2000) Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic Biol Med*, 28, 625-35.
- JOSHI, D., SINCLAIR, A., TSUI, J. & SARIN, S. (2011) Incomplete removal of great saphenous vein is the most common cause for recurrent varicose veins. *Angiology*, 62, 198-201.
- KAKHLON, O. & CABANTCHIK, Z. I. (2002) The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes(1). *Free Radic Biol Med*, 33, 1037-46.
- KARATEPE, O., UNAL, O., UGURLUCAN, M., KEMIK, A., KARAHAN, S., AKSOY, M. & KURTOGLU, M. (2010) The impact of valvular oxidative stress on the development of venous stasis ulcer valvular oxidative stress and venous ulcers. *Angiology*, 61, 283-8.
- KONYA, C. & FERDINANDY, P. (2006) Vitamin C: new role of the old vitamin in the cardiovascular system? *Br J Pharmacol*, 147, 125-7.
- KOWALEWSKI, R., SOBOLEWSKI, K., WOLANSKA, M. & GACKO, M. (2004) Matrix metalloproteinases in the vein wall. *Int Angiol*, 23, 164-9.
- LABROPOULOS, N., GIANNOUKAS, A. D., DELIS, K., MANSOUR, M. A., KANG, S. S., NICOLAIDES, A. N., LUMLEY, J. & BAKER, W. H. (1997) Where does venous reflux start? *J Vasc Surg*, 26, 736-42.
- LANDMESSER, U., DIKALOV, S., PRICE, S. R., MCCANN, L., FUKAI, T., HOLLAND, S. M., MITCH, W. E. & HARRISON, D. G. (2003) Oxidation of

- tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest*, 111, 1201-9.
- LASSEGUE, B. & CLEMPUS, R. E. (2003) Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 285, R277-97.
- LAURIKKA, J. O., SISTO, T., TARKKA, M. R., AUVINEN, O. & HAKAMA, M. (2002) Risk indicators for varicose veins in forty- to sixty-year-olds in the Tampere varicose vein study. *World J Surg*, 26, 648-51.
- LEE, S., LEE, W., CHOE, Y., KIM, D., NA, G., IM, S., KIM, J., KIM, M. & CHO, J. (2005) Gene expression profiles in varicose veins using complementary DNA microarray. *Dermatol Surg*, 31, 391-5.
- LIM, C. S. & DAVIES, A. H. (2009) Pathogenesis of primary varicose veins. *Br J Surg*, 96, 1231-42.
- LIM, C. S., GOHEL, M. S., SHEPHERD, A. C., PALEOLOG, E. & DAVIES, A. H. (2010) Venous Hypoxia: A Poorly Studied Etiological Factor of Varicose Veins. *J Vasc Res*, 48, 185-194.
- LIOCHEV, S. I. & FRIDOVICH, I. (2002) The Haber-Weiss cycle -- 70 years later: an alternative view. *Redox Rep*, 7, 55-7; author reply 59-60.
- LOZANO, F., JIMÉNEZ-COSSÍO, J. A. & ULLOA, J. (2001) Chronic venous insufficiency in Spain. An epidemiological study (RELIEF). *Angiología*, 53, 5-16.
- MACKAY, D. (2001) Hemorrhoids and varicose veins: a review of treatment options. *Altern Med Rev*, 6, 126-40.
- MALÝ I, JULÍNEK S, WINKLER L. (2010) Five years' experience in endovenous laser therapy of lower extremity varicose veins. *Int Surg*; 95(3):221-6.
- MARKLUND, S. L. (1984) Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. *J Clin Invest*, 74, 1398-403.

- MARTINEZ, M. J., BONFILL, X., MORENO, R. M., VARGAS, E. & CAPELLA, D. (2005) Phlebotonics for venous insufficiency. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003229.
- MAY, J. M., QU, Z. C. & MENDIRATTA, S. (1998) Protection and recycling of alpha-tocopherol in human erythrocytes by intracellular ascorbic acid. *Arch Biochem Biophys*, 349, 281-9.
- MCCORD, J. M. & FRIDOVICH, I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*, 244, 6049-55.
- MCCORD, J. M. & FRIDOVICH, I. (1988) Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988). *Free Radic Biol Med*, 5, 363-9.
- MEISSNER, M. H., GLOVICZKI, P., BERGAN, J., KISTNER, R. L., MORRISON, N., PANNIER, F., PAPPAS, P. J., RABE, E., RAJU, S. & VILLAVICENCIO, J. L. (2007) Primary chronic venous disorders. *J Vasc Surg*, 46 Suppl S, 54S-67S.
- MENDES, R. R., MARSTON, W. A., FARBER, M. A. & KEAGY, B. A. (2003) Treatment of superficial and perforator venous incompetence without deep venous insufficiency: is routine perforator ligation necessary? *J Vasc Surg*, 38, 891-5.
- MICHIELS, C., BOUAZIZ, N. & REMACLE, J. (2002) Role of the endothelium and blood stasis in the appearance of varicose veins. *Int Angiol*, 21, 1-8.
- MILLER, D. M., BUETTNER, G. R. & AUST, S. D. (1990) Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic Biol Med*, 8, 95-108.
- MONCADA, S. & PALMER, R. M. (1991) Biosynthesis and actions of nitric oxide. *Semin Perinatol*, 15, 16-9.
- NAOUM, J. J. & HUNTER, G. C. (2007) Pathogenesis of varicose veins and implications for clinical management. *Vascular*, 15, 242-9.
- NAOUM, J. J., HUNTER, G. C., WOODSIDE, K. J. & CHEN, C. (2007) Current advances in the pathogenesis of varicose veins. *J Surg Res*, 141, 311-6.

- NAOUM, J. J., HUNTER, G. C., WOODSIDE, K. J. & CHEN, C. (2007) Current advances in the pathogenesis of varicose veins. *J Surg Res*, 141, 311-6.
- NICOLAIDES, A. N. (2003) From symptoms to leg edema: efficacy of Daflon 500 mg. *Angiology*, 54 Suppl 1, S33-44.
- NIKI, E. (2010) Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med*, 49, 503-15.
- NIKOLAIDIS, M. G. & JAMURTAS, A. Z. (2009) Blood as a reactive species generator and redox status regulator during exercise. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 490, 77-84.
- NOZIK-GRAYCK, E., SULIMAN, H. B. & PIANTADOSI, C. A. (2005) Extracellular superoxide dismutase. *Int J Biochem Cell Biol*, 37, 2466-71.
- NYAMEKYE, I., SHEPHARD, N. A., DAVIES, B., HEATHER, B. P. & EARNSHAW, J. J. (1998) Clinicopathological evidence that neovascularisation is a cause of recurrent varicose veins. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 15, 412-5.
- PADAYATTY, S. J. & LEVINE, M. (2001) New insights into the physiology and pharmacology of vitamin C. *CMAJ*, 164, 353-5.
- PASSERINI, A. G., MILSTED, A. & RITTGERS, S. E. (2003) Shear stress magnitude and directionality modulate growth factor gene expression in preconditioned vascular endothelial cells. *J Vasc Surg*, 37, 182-90.
- PASTOR, N., WEINSTEIN, H., JAMISON, E. & BRENOWITZ, M. (2000) A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. *J Mol Biol*, 304, 55-68.
- PORTO, L. C., AZIZI, M. A., PELAJO-MACHADO, M., MATOS DA, S. P. & LENZI, H. L. (2002) Elastic fibers in saphenous varicose veins. *Angiology*, 53, 131-40.
- PSAILA, J. V. & MELHUIISH, J. (1989) Viscoelastic properties and collagen content of the long saphenous vein in normal and varicose veins. *Br J Surg*, 76, 37-40.

- PUTZ, R., PABST, R., PUTZ, R. & SOBOTTA, J. (2006) Sobotta: Atlas de anatomía. tronco, abdomen y miembro inferior. . Ed. Médica Panamericana, 22 ed.
- RAFFETTO, J. D. & KHALIL, R. A. (2008a) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol*, 75, 346-59.
- RAFFETTO, J. D. & KHALIL, R. A. (2008b) Mechanisms of varicose vein formation: valve dysfunction and wall dilation. *Phlebology*, 23, 85-98.
- RAJU-VILLAVICENCIO. (1999) Tratamiento quirúrgico de las enfermedades venosas., 1 edic. Mc Graw-Hill interamericana editores SA. (2): 17-59.
- RATHORE, R., ZHENG, Y.-M., NIU, C.-F., LIU, Q.-H., KORDE, A., HO, Y.-S. & WANG, Y.-X. (2008) Hypoxia activates NADPH oxidase to increase [ROS]_i and [Ca²⁺]_i through the mitochondrial ROS-PKC[ϵ] signaling axis in pulmonary artery smooth muscle cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 45, 1223-1231.
- ROBERTSON, L., EVANS, C. & FOWKES, F. G. (2008) Epidemiology of chronic venous disease. *Phlebology*, 23, 103-11.
- RUTHERFORD, E. E., KIANIFARD, B., COOK, S. J., HOLDSTOCK, J. M. & WHITELEY, M. S. (2001) Incompetent perforating veins are associated with recurrent varicose veins. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 21, 458-60.
- SAHARAY, M., SHIELDS, D. A., GEORGIANNOS, S. N., PORTER, J. B., SCURR, J. H. & COLERIDGE SMITH, P. D. (1998) Endothelial activation in patients with chronic venous disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 15, 342-9.
- SALEH, L. & PLIETH, C. (2010) Total low-molecular-weight antioxidants as a summary parameter, quantified in biological samples by a chemiluminescence inhibition assay. *Nat. Protocols*, 5, 1627-1634.
- SALES, C. M., ROSENTHAL, D., PETRILLO, K. A., JERIVS, H. S., MATSUURA, J., CLARK, M. D., PONTORIERO, M. A., SYRACUSE, D. C. & LUKA, N. L.

- (1998) The valvular apparatus in venous insufficiency: a problem of quantity? *Ann Vasc Surg*, 12, 153-5.
- SANSILVESTRI-MOREL, P., FIORETTI, F., RUPIN, A., SENNI, K., FABIANI, J. N., GODEAU, G. & VERBEUREN, T. J. (2007) Comparison of extracellular matrix in skin and saphenous veins from patients with varicose veins: does the skin reflect venous matrix changes? *Clin Sci (Lond)*, 112, 229-39.
- SANSILVESTRI-MOREL, P., RUPIN, A., JULLIEN, N. D., LEMBREZ, N., MESTRIES-DUBOIS, P., FABIANI, J. N. & VERBEUREN, T. J. (2005) Decreased production of collagen Type III in cultured smooth muscle cells from varicose vein patients is due to a degradation by MMPs: possible implication of MMP-3. *J Vasc Res*, 42, 388-98.
- SCOTT, T. E., LAMORTE, W. W., GORIN, D. R. & MENZOIAN, J. O. (1995) Risk factors for chronic venous insufficiency: a dual case-control study. *J Vasc Surg*, 22, 622-8.
- SIES, H. (1985) Oxidative stress: Introductory Remarks. In: *Oxidative Stress*, edited by Sies H. London, Academic Press, 1-8.
- SOMERS, P. & KNAAPEN, M. (2006) The histopathology of varicose vein disease. *Angiology*, 57, 546-55.
- STONEBRIDGE, P. A., CHALMERS, N., BEGGS, I., BRADBURY, A. W. & RUCKLEY, C. V. (1995) Recurrent varicose veins: a varicographic analysis leading to a new practical classification. *Br J Surg*, 82, 60-2.
- STRUCKMANN, J. R. (1999) Clinical efficacy of micronized purified flavonoid fraction: an overview. *J Vasc Res*, 36 Suppl 1, 37-41.
- STUART, W. P., ADAM, D. J., ALLAN, P. L., RUCKLEY, C. V. & BRADBURY, A. W. (1998) Saphenous surgery does not correct perforator incompetence in the presence of deep venous reflux. *J Vasc Surg*, 28, 834-8.

- TAKASE, S., PASCARELLA, L., BERGAN, J. J. & SCHMID-SCHONBEIN, G. W. (2004a) Hypertension-induced venous valve remodeling. *J Vasc Surg*, 39, 1329-34.
- TAKASE, S., PASCARELLA, L., LEROND, L., BERGAN, J. J. & SCHMID-SCHONBEIN, G. W. (2004b) Venous hypertension, inflammation and valve remodeling. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 28, 484-93.
- TORRES, P., GALLEGUILLOS, P., LISSI, E. & LÓPEZ-ALARCÓN, C. (2008) Antioxidant capacity of human blood plasma and human urine: Simultaneous evaluation of the ORAC index and ascorbic acid concentration employing pyrogallol red as probe. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 9171-9175.
- TOUYZ, R. M. (2005) Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal*, 7, 1302-14.
- TOUYZ, R. M., CHEN, X., TABET, F., YAO, G., HE, G., QUINN, M. T., PAGANO, P. J. & SCHIFFRIN, E. L. (2002) Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res*, 90, 1205-13.
- TRAUB, O. & BERK, B. C. (1998) Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18, 677-85.
- TURTON, E. P., SCOTT, D. J., RICHARDS, S. P., WESTON, M. J., BERRIDGE, D. C., KENT, P. J. & KESTER, R. C. (1999) Duplex-derived evidence of reflux after varicose vein surgery: neoreflux or neovascularisation? *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 17, 230-3.
- VALENTINE, J. S., PANTOLIANO, M. W., MCDONNELL, P. J., BURGER, A. R. & LIPPARD, S. J. (1979) pH-dependent migration of copper(II) to the vacant zinc-binding site of zinc-free bovine erythrocyte superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 4245-9.

- VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M. T. D., MAZUR, M. & TELSER, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44-84.
- VALKO, M., MORRIS, H. & CRONIN, M. T. (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*, 12, 1161-208.
- VAN CLEEF, J. F., HUGENTOBLE, J. P., DESVAUX, P., GRITON, P. & CLOAREC, M. (1992) [Endoscopic study of reflux of the saphenous valve]. *J Mal Vasc*, 17 Suppl B, 113-6.
- VAN RIJ, A. M., JIANG, P., SOLOMON, C., CHRISTIE, R. A. & HILL, G. B. (2003) Recurrence after varicose vein surgery: a prospective long-term clinical study with duplex ultrasound scanning and air plethysmography. *J Vasc Surg*, 38, 935-43.
- VASSALLE, C., MASINI, S., CARPEGGIANI, C., L'ABBATE, A., BONI, C. & ZUCHELLI, G. C. (2004) In vivo total antioxidant capacity: comparison of two different analytical methods. *Clin Chem Lab Med*, 42, 84-9.
- VEGLIA, F., CAVALCA, V. & TREMOLI, E. (2010) OXY-SCORE: a global index to improve evaluation of oxidative stress by combining pro- and antioxidant markers. *Methods Mol Biol*, 594, 197-213.
- VEGLIA, F., CIGHETTI, G., DE FRANCESCHI, M., ZINGARO, L., BOCCOTTI, L., TREMOLI, E. & CAVALCA, V. (2006) Age- and gender-related oxidative status determined in healthy subjects by means of OXY-SCORE, a potential new comprehensive index. *Biomarkers*, 11, 562-73.
- VEGLIA, F., WERBA, J. P., TREMOLI, E., SQUELLERIO, I., SISILLO, E., PAROLARI, A., MINARDI, F. & CAVALCA, V. (2009) Assessment of oxidative stress in coronary artery bypass surgery: comparison between the global index OXY-SCORE and individual biomarkers. *Biomarkers*, 14, 465-72.

- VESKOUKIS, A. S., NIKOLAIDIS, M. G., KYPAROS, A. & KOURETAS, D. (2009) Blood reflects tissue oxidative stress depending on biomarker and tissue studied. *Free Radical Biology and Medicine*, 47, 1371-1374.
- VON ZASTROW, M., TRITTON, T. R. & CASTLE, J. D. (1986) Exocrine secretion granules contain peptide amidation activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 3297-301.
- WALI, M. A. & EID, R. A. (2002) Changes of elastic and collagen fibers in varicose veins. *Int Angiol*, 21, 337-43.
- WALI, M. A., DEWAN, M. & EID, R. A. (2003) Histopathological changes in the wall of varicose veins. *Int Angiol*, 22, 188-93.
- WEISIGER, R. A. & FRIDOVICH, I. (1973) Superoxide dismutase. Organelle specificity. *J Biol Chem*, 248, 3582-92.
- WHALEY-CONNELL, A., MCCULLOUGH, P. A. & SOWERS, J. R. (2011) The role of oxidative stress in the metabolic syndrome. *Rev Cardiovasc Med*, 12, 21-9.
- WILSON, J. X. (2005) Regulation of vitamin C transport. *Annu Rev Nutr*, 25, 105-25.
- WITKO-SARSAT, V., FRIEDLANDER, M., CAPEILLERE-BLANDIN, C., NGUYEN-KHOA, T., NGUYEN, A. T., ZINGRAFF, J., JUNGERS, P. & DESCAMPS-LATSCHA, B. (1996) Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int*, 49, 1304-13.
- WOLIN, M. S. (2011) Plasma Glutathione Peroxidase Activity is Potentially a Key Regulator of Vascular Disease-Associated Thrombosis. *Circulation*, 123, 1923-4.
- WOODSIDE, K. J., HU, M., BURKE, A., MURAKAMI, M., POUNDS, L. L., KILLEWICH, L. A., DALLER, J. A. & HUNTER, G. C. (2003) Morphologic characteristics of varicose veins: possible role of metalloproteinases. *J Vasc Surg*, 38, 162-9.

- YASIM, A., KILINC, M., ARAL, M., OKSUZ, H., KABALCI, M., EROGLU, E. & IMREK, S. (2008) Serum concentration of procoagulant, endothelial and oxidative stress markers in early primary varicose veins. *Phlebology*, 23, 15-20.
- YONG, K. & KHWAJA, A. (1990) Leucocyte cellular adhesion molecules. *Blood Rev*, 4, 211-25.
- YOUNG, I. S. & WOODSIDE, J. V. (2001) Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*, 54, 176-86.
- ZBRODOWSKI, A., GUMENER, R., GAJISIN, S., MONTANDON, D. & BEDNARKIEWICZ, M. (1995) Blood supply of subcutaneous tissue in the leg and its clinical application. *Clin Anat*, 8, 202-7.
- ZHENQUAN, J., SOUMYA, S., HONG, Z., YUNBO, L. & P., M. H. (2010) Spectrofluorometric Measurement of Reduced Glutathione Levels in Human Neuronal Cells. *Methods in Redox Signaling*.

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

INTRODUCCIÓN**Página**

Figura 1. Clasificación de las venas del miembro inferior (Fuente: Sobotta: Atlas de anatomía. 2006).	2
Figura 2. Procesos inflamatorios en una válvula con insuficiencia venosa (Adaptado de (Bergan, 2007).	11
Figura 3. Esquema de los posibles mecanismos implicados en la formación de várices. (Adaptado de (Lim and Davies, 2009).	14
Figura 4. Reacciones de formación y eliminación de ROS mediante los principales sistemas de defensa antioxidante. Adaptado de (Valko et al., 2007).	31
Figura 5. Criterios de elección y validación un biomarcador. Adaptado de (Dalle-Donne et al., 2006)	36

MATERIAL Y MÉTODOS

Figura 6. Método de cuantificación de ácido úrico mediante el método del Amplex Red	49
Figura 7. Mecanismo simplificado de oxidación de fluoresceína mediante ROO ^o generado por descomposición térmica del AAPH que fundamenta el método ORAC. — representa bloqueo y —> representa activación	50
Figura 8. Área neta bajo la curva empleada en la determinación del valor ORAC	52
Figura 9. Mecanismo simplificado que fundamenta el método TAC de inhibición de la luminiscencia. AH es un compuesto aromático donador de hidrógeno, denominado “ <i>enhancer</i> ”, AO representa el/los antioxidante(s) de bajo peso molecular presente(s) en la muestra a analizar, AP es la aminoftalato, AQ es una diazaquinona, L es el luminol y SE es el estado conformacional de la HRP	55
Figura 10. Mecanismo de oxidación del Amplex Red implicado en la cuantificación de la actividad catalasa	56
Figura 11. Sistema de preparación de geles en gradiente	61

RESULTADOS

Figura 12. Curvas de disminución de fluorescencia inducida por radicales peroxilos en ausencia de antioxidantes (Blanco) y en presencia de plasma diluido de controles (C) y pacientes con varices primarias (VP) y varices recidivantes (VR). Los datos representan el valor promedio y las barras de error el SEM (error estándar de la media). Entre paréntesis se indica el número de sujetos experimentales72

Figura 13. Valores ORAC plasmático en controles (C) y pacientes con varices primarias (VP) y varices recidivantes (VR). Los datos representan el valor promedio y las barras de error el SEM (error estándar de la media). Entre paréntesis se indica el número de sujetos experimentales73

Figura 14. Variación de la señal de luminiscencia después de la adición de plasma diluido de controles (C) y pacientes con varices primarias (VP) y varices recidivantes (VR). Los datos representan el valor promedio, en todos los casos el coeficiente de variabilidad como medida de dispersión es inferior al 10%. Entre paréntesis se indica el número de sujetos experimentales74

Figura 15. Valores TAC plasmático en controles (C) y pacientes con varices primarias (VP) y varices recidivantes (VR). Los datos representan el valor promedio y las barras de error el SEM (error estándar de la media). Entre paréntesis se indica el número de sujetos experimentales.* significa diferencia estadística de VP y VR respecto a los controles y + entre VP y VR. *** $p < 0.001$ y +++ $p < 0.01$ 75

Figura 16. Niveles de glutatión reducido plasmático en controles (C) y pacientes con varices primarias (VP) y varices recidivantes (VR). Los datos representan el valor promedio y las barras de error el SEM (error estándar de la media). Entre paréntesis se indica el número de sujetos experimentales. * significa diferencia estadística de VP y VR respecto a los controles y + entre VP y VR. *** $p < 0.001$ y +++ $p < 0.01$ 76

Figura 17. Niveles de ácido úrico plasmático en controles (C) y pacientes con varices primarias (VP) y varices recidivantes (VR). Los datos representan el valor promedio y las barras de error el SEM (error estándar de la media). Entre paréntesis se indica el número de sujetos experimentales77

Figura 18. Actividad catalasa plasmático en controles (C) y pacientes con varices primarias (VP) y varices recidivantes (VR). Los datos representan el valor promedio y las barras de error el SEM (error estándar de la media). Entre paréntesis se indica el número de sujetos experimentales. * significa diferencia estadística de VP y VR respecto a los controles. *** $p < 0.001$ 78

Figura 19. Proteínas plasmáticas carboniladas en controles (C) y pacientes con varices primarias (VP) y varices recidivantes (VR). Los datos representan el valor promedio y las barras de error el SEM (error estándar de la media). Entre paréntesis se indica el número de sujetos experimentales. * significa diferencia estadística de VP y VR respecto a los controles y + entre VP y VR. *** $p < 0.001$ y ++ $p < 0.01$ 79

Figura 20. Proteínas plasmáticas modificadas por MDA en controles (C) y pacientes con varices primarias (VP) y varices recidivantes (VR). Los datos representan el valor promedio y las barras de error el SEM (error estándar de la media). Entre paréntesis se indica el número de sujetos experimentales. * significa diferencia estadística de VP y VR respecto a los controles y + entre VP y VR. * $p < 0.05$ y + $p < 0.05$ 80

Figura 21. Productos avanzados de oxidación de proteínas plasmáticas en controles (C) y pacientes con varices primarias (VP) y varices recidivantes (VR). Los datos representan el valor promedio y las barras de error el SEM (error estándar de la media). Entre paréntesis se indica el número de sujetos experimentales81

Figura 22. Actividad xantina oxidasa plasmática en controles (C) y pacientes con varices primarias (VP) y varices recidivantes (VR). Los datos representan el valor promedio y las barras de error el SEM (error estándar de la media). Entre paréntesis se indica el número de sujetos experimentales82

Figura 23. Actividad mieloperoxidasa plasmática en controles (C) y pacientes con varices primarias (VP) y varices recidivantes (VR). Los datos representan el valor promedio y las barras de error el SEM (error estándar de la media). Entre paréntesis se indica el número de sujetos experimentales83

Figura 24. Actividad de metaloproteinasas plasmáticas A) MMP-9 y B) MMP-2 en controles (C) y pacientes con varices primarias (VP) y varices recidivantes (VR). C) Zimografía de las muestras de plasma de pacientes con varices que evidencia la presencia de MMPs. Los datos representan el valor promedio y las barras de error el SEM (error estándar de la media). + significa diferencia estadística entre VP y VR. * $p < 0.05$ y + $p < 0.05$. Entre paréntesis se indica el número de sujetos experimentales84

Figura 25. Gráficas Q-Q de normalidad de los parámetros incluidos en el OxyVen86

Figura 26. Esquema representativo de los indicadores parciales (OXY y ANTIOX) e indicador global (OxyVen) en los tres grupos experimentales. En los recuadros se indican los parámetros incluidos para su cálculo. VP, varices primarias, VR, varices recidivantes99

TABLAS

Tabla 1. Expresión y/o actividad de MMPs y de TIMPs en muestras de pacientes con y sin várices	13
Tabla 2. Biomarcadores de estrés oxidativo en diversas enfermedades humanas	34
Tabla 3. Criterios de inclusión empleados para la selección de pacientes y sujetos control.	45
Tabla 4. Composición de los geles de separación y concentración para la cuantificación de MMP-2 y MMP-9 mediante zimografía.	62
Tabla 5. Datos demográficos y clínicos de los sujetos experimentales.	68
Tabla 6. Diámetros venosos en los miembros inferiores de sujetos control.	69
Tabla 7. Características del sistema venoso de pacientes con varices primarias.	70
Tabla 8. Características del sistema venoso de pacientes con varices recidivantes.	70
Tabla 9. Prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov de los parámetros incluidos en el OxyVen.....	85
Tabla 10. Parámetros OxyVen.....	89

ANEXO I

SERVICIO DE ANGIOLOGIA Y CIRUGIA VASCULAR

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Yo, D..... autorizo al Servicio de Angiología y Cirugía Vascular de los Hospitales La Zarzuela/La Moraleja/Moncloa a conservar una muestra biológica mía vascular y sanguínea que se obtendrá durante la intervención de varices y de cualquier otra intervención que se derive de la anterior.

Previamente a conceder esta autorización he sido informado/a sobre los siguientes aspectos de este consentimiento:

- 1.- He recibido información sobre las razones por la que me solicitan la muestra biológica.
- 2.- La muestra obtenida podrá utilizarse para investigaciones biomédicas relacionadas o no con la enfermedad o proceso que padezco, siempre que el fin último sea la mejora de la salud.
- 3.- El Servicio de Angiología y Cirugía Vascular del Hospital La Zarzuela/La Moraleja/Moncloa garantizarán la más estricta confidencialidad de los datos facilitados en cumplimiento de lo dispuesto en la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal. En el caso en que la muestra biológica sea cedida a otro grupo fuera de nuestro hospital para realización de investigaciones, también se mantendrá la confidencialidad de mis datos.
- 4.- En cualquier momento podré ejercitar los derechos de acceso, rectificación cancelación o revocación de este consentimiento sin que ello conlleve una merma en la asistencia que recibo en el Hospital. La custodia de este documento se realizará por parte de La Zarzuela/La Moraleja/Moncloa.
- 5.- La cesión de la muestra biológica para fines de investigación se realiza de modo altruista y voluntario, renunciando a recibir ningún tipo de compensación por la misma.

Madrid.....de..... de 200....

Firma:

DNI:

REFERENCIA DE LA MUESTRA

Dr/a.....

Hospital/Servicio/Unidad.....