



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências da Saúde

**As metaloproteinasas, os inibidores tecidulares de
metaloproteinasas e o fator de crescimento
transformador- β 1 na doença venosa crónica dos
membros inferiores**

Pedro Miguel Azevedo Serralheiro

Tese para obtenção do Grau de Doutor em
Medicina
(3º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Carlos Manuel Costa Almeida
Co-orientador: Prof. Doutor José Ignacio Verde Lusquiños

Covilhã, Julho de 2019



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

**As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de
metaloproteinases e o fator de crescimento
transformador- β 1 na doença venosa crónica dos
membros inferiores**

Pedro Miguel Azevedo Serralheiro

Tese para obtenção do Grau de Doutor em
Medicina
(3º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Carlos Manuel Costa Almeida
Co-orientador: Prof. Doutor José Ignacio Verde Lusquiños

Covilhã, Julho de 2019

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador- β 1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

Este trabalho teve o apoio de um subsídio de interno doutorando (SFRH/SINTD/60063/2009) e de uma bolsa (*European Venous Forum Pump Priming Grant 2010*), respetivamente concedidos pela Fundação para a Ciência e Tecnologia e pelo *European Venous Forum*.

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

Dedicatória

À Andreia, companheira inestimável de todas as minhas *viagens*, e ao meu filho Henrique, que me aquece o coração e me faz sorrir até no pior dos dias.

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

Agradecimentos

Um trabalho de doutoramento é sempre fruto de um esforço coletivo, ainda que dependa largamente do entusiasmo, da resiliência e da capacidade de trabalho do seu autor. Por esta razão, quero expressar a minha gratidão a todos os que contribuíram para a sua concretização.

Aos meus orientadores científicos, Professor Doutor Carlos Costa Almeida e Professor Doutor Ignacio Verde, pela receptividade e entusiasmo com que aceitaram o desafio de orientar este trabalho, pela partilha de conhecimentos que tanto o enriqueceram e pelo tempo pessoal que dispenderam para que pudesse ser finalizado.

Ao Centro de Investigação em Ciências da Saúde e aos seus investigadores, em particular à Professora Doutora Elisa Cairrão e ao Professor Doutor Cláudio Maia, pelas suas manifestações de amizade, disponibilidade e ajuda em momentos críticos.

À Universidade da Beira Interior e aos seus membros, em especial ao Professor Doutor Luís Silveira, não só pelo interesse e encorajamento que sempre expressou em relação a este trabalho, mas sobretudo por ser um exemplo de excelência e um amigo de grande valor, à Dr.^a Catarina Ferreira e ao Dr. António Novais, cuja companhia e o auxílio prestado tornaram as horas infindáveis de trabalho de laboratório mais suportáveis, e ao Professor Doutor Jorge Gama, pela prontidão e o cuidado com que sempre respondeu às minhas dúvidas relativas ao tratamento estatístico dos dados.

Ao Serviço de Cirurgia Cardiorácica e Transplantação de Órgãos Torácicos do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, em particular ao Professor Doutor Manuel Antunes pelas oportunidades proporcionadas de recolher as amostras de veia que compuseram o grupo de controlo.

Ao Serviço de Cirurgia Geral do Centro Hospitalar da Cova da Beira, pela oportunidade e pela paciência que sempre revelou durante o processo de recolha das veias que compuseram o grupo experimental.

A todos os doentes cuja generosidade os conduziu a pôr a sua privacidade ao serviço da ciência.

Aos meus pais que sempre alimentaram a minha sede de conhecimento e nunca se assustaram com o mais surpreendente e inoportuno “porquê?”. À minha irmã, pela reciprocidade no afeto e na admiração que me fortalecem em face das adversidades. Ao meu cunhado, pelo modo

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

exemplar e inspirador com que persegue os seus objetivos de vida. Ao meu sobrinho cujas traquinices me alimentam o sorriso e me prendem o coração.

À minha esposa... Ciente de que a tentativa de comentar e agradecer o seu contributo neste trabalho é incompatível com a brevidade que esta secção pressupõe, deixo apenas o meu profundo e reconhecido apreço pela sua inesgotável dedicação ao nosso projeto familiar e pela sua generosa colaboração nos meus sucessos profissionais e académicos. Sincera e justa é a dedicatória que lhe faço.

Resumo

A doença venosa crónica (DVeC) é muito prevalente a nível mundial e o seu tratamento, bem como o das suas complicações, acarretam elevados custos socioeconómicos. A sua fisiopatologia ainda não é completamente conhecida, facto que tem contribuído para o atraso do desenvolvimento de terapias eficazes e que suspendam, efetivamente, a evolução da doença. Estudos prévios demonstraram que a desregulação de metaloproteinases (MMP) e dos seus inibidores (TIMP) contribuem, muito provavelmente, para o processo patológico na parede venosa. Também são conhecidos os resultados de estudos que sugerem que o fator transformador beta 1 (TGF- β 1) e os seus recetores (TGF β BR) podem interferir na expressão e na atividade de MMP e TIMP, podendo assim estar implicados na fisiopatologia da DVeC. Não obstante, os dados disponíveis na literatura não são conclusivos e não têm em consideração o fator estágio de evolução da doença. Por esta razão, no presente trabalho, foram realizados dois estudos complementares com o objetivo de contribuir para o conhecimento científico nesta área.

O primeiro estudo, de natureza observacional, comparou amostras de veias dos membros inferiores colhidas em 13 indivíduos sem doença venosa e 31 indivíduos com DVeC (19 em estágio inicial e 12 em estágio avançado da doença) para analisar as diferenças na expressão génica de MMP1, MMP2, MMP8, MMP9, MMP12, MMP13, TIMP1, TIMP2, TIMP3, TIMP4, TGF β BR1, TGF β BR2, e TGF β BR3 e na imunomarcagem de MMP2, TIMP2 e TGF β BR2 na parede venosa. As amostras foram agrupadas segundo a localização anatómica da amostra venosa e o estágio evolutivo da doença, tendo sido sujeitas a *polymerase chain reaction* convencional e quantitativa e depois a imuno-histoquímica. O segundo estudo, de natureza intervencional, comparou amostras de veia grande safena saudável de oito sujeitos, que foram divididas em dois segmentos e cultivadas *in vitro*, tendo sido um dos segmentos tratado com TGF- β 1 e o outro não, com o propósito de analisar as diferenças na expressão de MMP2, MMP9, MMP12, TIMP1, TIMP2, TIMP3, TIMP4, TGF β BR2 e TGF β BR3 entre os grupos de amostras e demonstrar um efeito direto do TGF- β 1 na expressão de MMP e TIMP na parede venosa.

Os resultados do primeiro estudo revelaram uma diminuição da expressão génica de MMP12, TIMP2, TIMP3, TIMP4, e TGF β BR2 na parede de veias insuficientes, quando comparadas com veias saudáveis. Quando o fator estágio evolutivo da doença foi considerado, os resultados demonstraram uma expressão diminuída de MMP9 e de TGF β BR3, assim como um aumento da expressão de MMP2 e TIMP3 em veias insuficientes no estágio avançado da doença. Os resultados imuno-histoquímicos, sobretudo para a túnica íntima, foram coerentes com os resultados da expressão génica. Já no segundo estudo foi demonstrado o aumento da expressão génica de MMP9, MMP12, TIMP1 e TIMP2 em amostras de veia tratadas com TGF- β 1, quando comparadas com as amostras não tratadas.

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador- β 1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

Em conclusão, poderá afirmar-se que existem, efetivamente, diferenças de expressão de MMP/TIMP em veias insuficientes, quando comparadas com veias saudáveis, e que o TGF- β 1 influencia diretamente a expressão de MMP/TIMP na parede venosa. Acresce ainda o facto da diminuição de expressão de TGFBR na parede venosa poder ter um papel importante na redução da influência do TGF- β 1 na desregulação da expressão local de MMP/TIMP em estádios avançados da DVeC.

Palavras-chave

Doença venosa crónica; Metaloproteinases da matriz (MMP); Inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP); Fator de crescimento transformador beta-1 (TGF- β 1); Recetores do fator de crescimento transformador beta-1 (TGFBR).

Abstract

Chronic venous disease (CvD) is a worldwide prevalent condition with a significant socioeconomic burden. Its pathophysiology is only just beginning to be understood, which has been delaying the development of efficient therapies able to suspend the disease progression. Previous studies showed that the dysregulation of matrix metalloproteinases (MMP) and their inhibitors (TIMP), within the varicose vein wall, may be implicated in the pathologic process. Moreover, it is highly plausible that MMP and TIMP expression and activity are affected by transforming growth factor beta-1 (TGF- β 1) and its signalling receptors (TGFBR), which can also be implicated in CvD pathophysiology. Nevertheless available data are inconsistent and disregard clinical progression. Hence, two studies were performed in order to contribute to scientific knowledge within this field.

The first study, an observational study, was undertaken to analyse genetic and immunohistochemical differences between lower limb vein samples harvested from 13 individuals without venous disease and from 31 individuals with CvD (19 on early stages and 12 on advanced stages of the disease). Samples were grouped based on anatomic harvest site and clinical progression and were subjected to gene expression analysis by conventional and quantitative polymerase chain reaction for MMP1, MMP2, MMP8, MMP9, MMP12, MMP13, TIMP1, TIMP2, TIMP3, TIMP4, TGFBR1, TGFBR2, and TGFBR3, and then to immunohistochemistry for immunolocalization of MMP2, TIMP2, and TGFBR2. The second study, an interventional one, was performed with eight subjects from whom healthy great saphenous vein samples were harvested. Each vein sample was divided into two segments, which were then cultivated separately *in vitro*, being one of the segments treated with TGF- β 1, as opposed to the other, in order to analyse the gene expression for MMP2, MMP9, MMP12, TIMP1, TIMP2, TIMP3, TIMP4, TGFBR2 e TGFBR3 and to demonstrate a direct effect of TGF- β 1 on MMP and TIMP gene expressions in the vein wall.

The results of the first study results showed a decreased gene expression of MMP12, TIMP2, TIMP3, TIMP4, and TGFBR2 in varicose veins when compared to controls. A decreased gene expression of MMP9 and TGFBR3 and an increased gene expression of MMP2 and TIMP3 were found in advanced clinical stages. Most immunohistochemistry results, mainly for tunica intima, were coherent with quantitative real time-polymerase chain reaction results. The second study showed a general increase of MMP9, MMP12, TIMP1 and TIMP2 gene expressions in TGF- β 1 treated samples when compared to non treated samples.

In conclusion, there are in fact MMP/TIMP gene expression differences between varicose and healthy veins and TGF- β 1 has a direct effect on MMP/TIMP expression in the vein wall. Moreover, the decreased expression of TGFBRs in the vein wall might suggest a reduction of TGF- β 1 participation in the MMP/TIMP imbalance in advanced stages of CvD.

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador- β 1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

Keywords

Chronic venous disease; Matrix metalloproteinases (MMP); Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP); Transforming growth factor beta-1 (TGF- β 1); Transforming growth factor beta-1 receptors (TGFBR).

Índice

1	Introdução	1
1.1	Informação geral sobre o sistema venoso	1
1.1.1	Embriologia	2
1.1.2	Histologia	3
1.1.3	Anatomia	4
1.1.4	Fisiologia	6
1.1.5	Fisiopatologia	7
1.2	Características gerais da doença venosa crónica dos membros inferiores	9
1.2.1	Definições e classificação da doença venosa crónica	9
1.2.2	Etiologia e fatores de risco	11
1.2.3	Epidemiologia	11
1.3	Alterações primárias da parede vascular na doença venosa crónica	12
1.3.1	Remodelação da matriz extracelular da parede vascular	13
1.3.2	Metaloproteinases e seus inibidores tecidulares	14
1.3.2.1	Estrutura das metaloproteinases	15
1.3.2.2	Tipos específicos de metaloproteinases e inibidores da metaloproteinases	16
1.3.2.3	Ativação das metaloproteinases	17
1.3.2.4	Os substratos das metaloproteinases	18
1.3.2.5	Níveis de metaloproteinases em veias varicosas primárias	19
1.3.2.6	Moduladores da expressão e atividade de metaloproteinases em veias varicosas	20
1.3.2.7	Efeito das metaloproteinases e dos inibidores de metaloproteinases em veias varicosas	21
1.3.3	O fator transformador de crescimento β -1	23
1.4	Tratamento da doença venosa crónica	23
2	Objetivos	27
3	Metodologia	29
3.1	Desenho da investigação	29
3.2	Recolha, preparação e análise das amostras	29
3.2.1	Extração de ácido ribonucleico e síntese de ácido desoxirribonucleico complementar	31
3.2.2	<i>Real time-polymerase chain reaction</i> convencional (RT-PCR)	31
3.2.3	<i>Quantitative real time-polymerase chain reaction</i> (qPCR)	32
3.2.4	Imuno-histoquímica	33
3.2.5	Cultura de veia grande safena	34
3.3	Características demográficas e clínicas dos participantes	34

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

3.4 Análise estatística dos dados	36
3.5 Considerações éticas e legais	37
4 Artigos publicados	39
4.1 Artigo I: <i>Variability of MMP/TIMP and TGF-B1 Receptors throughout the Clinical Progression of Chronic Venous Disease</i>	39
4.2 Artigo II: <i>Effect of TGF-beta1 on MMP/TIMP and TGF-beta1 receptors in great saphenous veins and its significance on chronic venous insufficiency</i>	54
4.3 Artigo III: <i>TGF-B1 in Vascular Wall Pathology: Unraveling Chronic Venous Insufficiency Pathophysiology</i>	63
5 Discussão	85
5.1 Discussão integrada dos principais resultados	86
6 Conclusões e implicações na investigação e na prática clínica	93
7 Referências	95
8 Anexos	111

Lista de Figuras

Figura 1 - Túnicas da parede venosa.

Figura 2 - Diagrama dos compartimentos do sistema venoso dos membros inferiores.

Figura 3 - Anatomia do sistema venoso superficial e profundo do membro inferior.

Figura 4 - Diagrama do processo de retorno venoso nos membros inferiores, dependente da bomba muscular.

Figura 5 - Inflamação local na parede venosa dá origem a insuficiência valvular e refluxo venoso.

Figura 6 - Espectro de alterações morfológicas e funcionais do sistema venoso dos membros inferiores, que vai desde as telangiectasias até às úlceras venosas.

Figura 7 - Diagrama da estrutura das principais metaloproteinases.

Figura 8 - Diagrama da ativação das metaloproteinases.

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Classificação clínica CEAP para a doença venosa crónica dos membros inferiores.

Tabela 2 - *Primers* usados nas experiências de RT-PCR.

Tabela 3 - Anticorpos primários usados nas experiências imuno-histoquímicas e respetivos controlos positivos, diluição e tempo de aplicação.

Tabela 4 - As características sociodemográficas e clínicas dos participantes nos estudos.

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

Lista de Acrónimos

cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i> ; Ácido desoxirribonucleico complementar
CEAP	Características clínicas, fatores etiológicos, distribuição anatómica e fisiopatologia
CHIVA	<i>Cure conservatrice et hémodynamique de l'insuffisance veineuse en ambulatoire</i>
CHCB	Centro Hospitalar da Cova da Beira
CHUC	Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra
CICS	Centro de Investigação em Ciências da Saúde
CMLV	Células musculares lisas vasculares
DAB	Diaminobenzidina
DEPC	Dietil pirocarbonato
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
DVeC	Doença venosa crónica
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> ; Soro bovino fetal
GADPH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HIF	<i>Hypoxia-inducible factor</i> ; Fatores induzidos pela hipoxia
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i> ; Molécula de adesão intercelular-1
LTBP	<i>Latent TGF-β binding protein</i>
MAPKs	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEC	Matriz extracelular
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i> ; Metaloproteinase da matriz
PAI-1	<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i> ; Inibidor do ativador do plasminogénio-1
PAR	<i>Protease-activated receptors</i> ; Recetores ativados por proteases
qPCR	<i>Quantitative real time-polymerase chain reaction</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> ; Ácido ribonucleico
RT-PCR	<i>Real time-polymerase chain reaction</i> convencional
SEPS	<i>Subfascial endoscopic perforator surgery</i>
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TGF- β 1	<i>Transforming growth factor beta-1</i> ; Fator de crescimento transformador beta-1
TGFBR	<i>Transforming growth factor beta receptor</i> ; Recetor do fator de crescimento transformador beta
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i> ; Inibidor tecidual de metaloproteinase
UBI	Universidade da Beira Interior
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i> ; Molécula de adesão celular vascular-1
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> ; Fator de crescimento endotelial vascular
VGS	Veia grande safena

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

1 Introdução

A doença venosa crónica (DVeC) é uma das patologias mais prevalentes na Europa Ocidental e nos Estados Unidos da América e é, lamentavelmente, negligenciada pelos próprios doentes, pelos profissionais de saúde (provavelmente pela sua natureza não letal)[1-3], e também pela comunidade académica e científica (facto que pode estar relacionado com a injusta reputação de "parente pobre" associada à Flebologia, no estudo da patologia vascular periférica)[4]. Os dados provenientes de países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento são ainda escassos, embora já existam estudos com amostras etnicamente diversas[5-7]; apesar disto, a magnitude do problema nestes países é ainda relativamente desconhecida[1-3]. Admite-se, no entanto, que esta patologia crónica e evolutiva, como o nome indicia, possa afetar até cerca de 60% da população adulta[1-3] e tenha um impacto adverso considerável na qualidade de vida dos doentes e na despesa pública dos países mais afetados, na medida em que, por exemplo, os custos diretos podem exceder os 10 milhões de euros por cada milhão de habitantes na Bélgica, França, Itália e Reino Unido[3].

Portugal, pela sua localização e clima, não se afasta das piores estimativas, assumindo-se que cerca de um terço da população adulta portuguesa poderá sofrer de alterações das macro e/ou microcirculação venosa dos membros inferiores e que, em consequência, os custos socioeconómicos associados ao diagnóstico, tratamento, absentismo laboral e à antecipação da reforma sejam bastante elevados[8].

Neste contexto, e em face das incertezas que ainda rodeiam a fisiopatologia da DVeC, toda a investigação dedicada ao estudo desta entidade clínica revela-se pertinente e necessária. A presente tese de doutoramento documenta um conjunto de estudos realizados com o objetivo de apresentar novos dados sobre a etiologia e a patogénese da DVeC, bem como contribuir para o desenvolvimento futuro de tratamentos mais eficientes. A sua estrutura inclui oito secções distintas: introdução, na qual se faz a revisão da literatura; objetivos e metodologia, onde se detalham os objetivos e se descrevem os estudos; artigos publicados (nos quais se apresentam os resultados obtidos); discussão integrada, na qual se tecem considerações breves sobre os principais resultados encontrados; conclusões e implicações dos resultados, onde se sugerem as implicações dos resultados na investigação e na prática clínica; referências; e, finalmente, anexos.

1.1 Informação geral sobre o sistema venoso

O sistema venoso é, juntamente com o sistema arterial, parte integrante do sistema circulatório, cumprindo estas últimas funções importantes como o transporte de nutrientes e

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crônica dos membros inferiores

oxigênio para as células do organismo, a remoção de resíduos metabólicos, o transporte de hormonas para diferentes localizações no corpo, a manutenção da função celular e da homeostase dos fluidos teciduais, para além de ter um papel fundamental nos mecanismos de defesa do organismo[9].

O fluxo sanguíneo para os tecidos é maioritariamente controlado, local e centralmente, através do débito cardíaco e da pressão arterial. O sistema arterial distribui o sangue pelos tecidos e controla a sua pressão. O sistema venoso, para além de fazer regressar o sangue proveniente dos tecidos ao coração (para que possa dar-se a hematose pulmonar e a posterior recirculação do sangue no sistema arterial), através da sua capacidade de contração e dilatação, também controla a quantidade de sangue que efetivamente chega ao coração assim como o seu débito sanguíneo. Quando o sistema dilata "armazena" o sangue e quando contrai lança maiores quantidades de sangue na circulação, dependendo das necessidades dos tecidos do organismo[9].

1.1.1 Embriologia

O sistema circulatório surge relativamente cedo no desenvolvimento embrionário a partir das ilhotas de Wolff, que são pequenos aglomerados celulares na mesoderme extraembrionária que reveste externamente a vesícula vitelínica. Isto ocorre normalmente por volta da terceira semana de gestação e contribui de forma eficiente na distribuição de nutrientes e na eliminação de detritos metabólicos[10, 11].

Alguns fatores foram identificados como sendo fundamentais no desenvolvimento vascular: o fator de crescimento derivado de plaquetas, que atua no recrutamento de pericitos e células musculares lisas; a angiopoietina-1 e o fator de crescimento transformador beta-1 (TGF- β 1), importantes na estabilização do vaso em desenvolvimento; e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), associado à diferenciação das células precursoras endoteliais e à remodelação vascular[12].

Durante a embriogénese, as veias primitivas derivam de plexos capilares. A sua função é levar sangue ao *sinus venosus*, que mais tarde dará origem a parte do coração[13]. Durante o desenvolvimento destas veias primitivas (por volta da quinta semana de gestação) surgem, por um processo de vasculogénese (por coalescência *in situ* de angioblastos)[10, 11], duas veias principais: as veias cardinais comuns direita e esquerda. Estas recebem sangue das veias vitelinas ou onfalomesentéricas, umbilicais, cardinais anteriores (que drenam a porção cefálica do embrião) e cardinais posteriores (que drenam a porção caudal do embrião), e drenam no *sinus venosus*.

As veias vitelinas darão origem aos sinusoides hepáticos, à porção hepatocárdica da veia cava, veia porta e veia mesentérica superior[10, 11]. As veias cardinais originarão mais tarde os troncos venosos principais: veias cava superior, jugular interna, veia braquiocefálica e seio

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador- β 1 na doença venosa crônica dos membros inferiores

coronário. As veias cardinais posteriores interconectam-se caudalmente no embrião, dando origem à chamada anastomose ilíaca, que mais tarde dará origem às veias ilíaca interna e sagrada média. Por volta da quinta à sétima semana de gestação surgem, por angiogênese [10, 11], as chamadas veias sub e supracarínais, que drenam nas veias cardinais posteriores e dão origem às veias ázigos, hemiázigos, cava inferior e renais. Com o desenvolvimento dos membros primitivos, surgem capilares que drenam nos chamados *sinus marginais* e depois nas veias cardinais anteriores (no caso dos membros superiores) e posteriores (no caso dos membros inferiores). Nos membros inferiores, os *sinus marginais* dão origem às veias fibulares, tibiais anteriores e veias pequena safena. As veias grande safena, assim como as femorais, poplíteas e tibiais posteriores, surgem diretamente das veias cardinais posteriores[13].

1.1.2 Histologia

O sistema venoso tem uma organização histológica comum. Os componentes teciduais que formam a parede venosa compreendem células endoteliais, células musculares lisas e matriz extracelular (MEC), incluindo fibras de colágeno e elastina. Estes componentes estão organizados em três camadas concêntricas: íntima, média e adventícia (cf. figura 1)[13, 14].

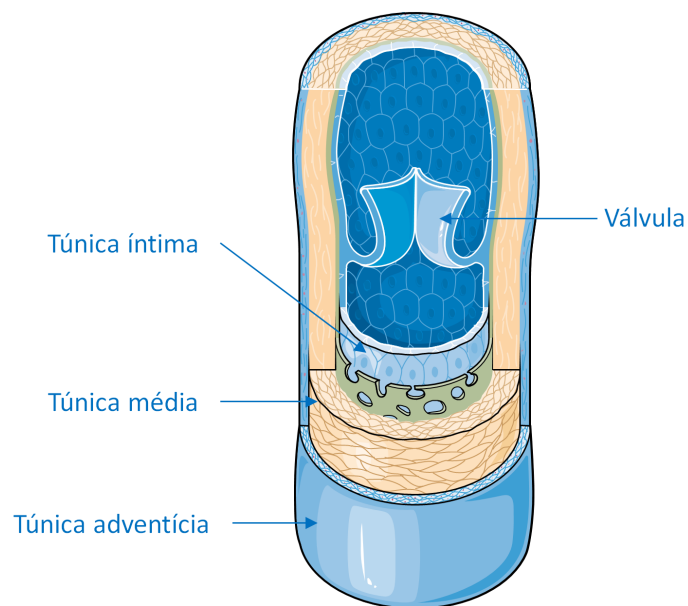


Figura 1 - Túnicas da parede venosa. Imagem adaptada com a autorização da *Servier medical art*[15].

A túnica íntima, mais interna, compreende o endotélio (epitélio pavimentoso simples que reveste internamente todos os vasos sanguíneos), a membrana basal adjacente (sobre a qual repousa o epitélio), a camada subendotelial (pequena quantidade de tecido conjuntivo laxo que só é facilmente observada nos vasos de maior calibre) e a lâmina elástica interna, só observada, à semelhança da anterior, nos vasos de maior calibre[13, 14]. As válvulas venosas

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

derivam da invaginação desta túnica, apresentando por isso um esqueleto de tecido conjuntivo muito fino revestido de endotélio[13].

A túnica média (intermédia) contém células musculares lisas e lâminas de fibras elásticas, incluindo a lâmina elástica externa, fibras de colagénio e proteoglicanos, em quantidade variável conforme o tipo de vaso e o seu calibre[13]. Apresenta uma camada mais interna longitudinal e uma camada mais externa circular[16].

A túnica adventícia (mais externa) é composta por tecido conjuntivo laxo, quantidades variáveis de fibras colagénicas e, em alguns casos, fibras elásticas. Pode também incluir uma camada longitudinal de células musculares lisas relativamente desorganizadas. Esta túnica possui ainda vasos sanguíneos destinados à nutrição dos tecidos da parede vascular (*os vasa vasorum*) que podem também surgir na túnica média das veias de maior calibre[13].

Sob a influência de fatores funcionais locais, esta estrutura em camadas sofre modificações segmentares e, em consequência, algumas características das túnicas são acentuadas, outras reduzidas ou omissas, e outras estruturas adicionais podem mesmo ser introduzidas[17, 18]. Assim, por exemplo: a túnica média da veia cava contém, quase exclusivamente, tecido conjuntivo; veias superficiais de maior calibre, como a veia grande safena (VGS), apresentam uma túnica média bastante espessa, com uma capacidade contráctil significativa; veias tributárias da VGS, por outro lado, apresentam uma túnica média menos desenvolvida, estando mais propensas ao efeito do aumento de pressão endoluminal e, conseqüentemente, a dilatações que conduzem a varicosidades[13].

1.1.3 Anatomia

A apresentação da anatomia de todo o sistema venoso excede o âmbito desta revisão, podendo ser encontrada em diversas publicações[13, 19]. Nesta secção descreve-se sucintamente a anatomia do sistema venoso dos membros inferiores.

O sistema venoso dos membros inferiores é normalmente dividido em três sistemas distintos - o superficial, o profundo e o perfurante - localizados em dois compartimentos principais: o compartimento superficial, limitado pela derme e a fáscia muscular, que contém as veias superficiais, e o compartimento profundo, limitado pela fáscia e o osso, que contém as veias profundas (cf. figura 2). Tal como a designação dos compartimentos sugere, as veias superficiais situam-se no compartimento superficial e as veias profundas no compartimento profundo. As veias perfurantes, termo derivado do facto de perfurarem a fáscia, unem o sistema superficial ao profundo e distinguem-se das veias comunicantes, que ligam as veias dentro do mesmo compartimento. O compartimento superficial compreende ainda um sub-compartimento denominado de safeno, limitado pela fáscia que cobre as veias safenas e a fáscia muscular[9, 13]. O retorno ao coração, do sangue proveniente dos membros inferiores, realiza-se através do sistema profundo. O sangue proveniente do sistema superficial passa,

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crônica dos membros inferiores

através das veias perfurantes ou das junções safenopoplíteia e safenofemoral, para o sistema profundo e daí segue no sentido cardiópeto[20].

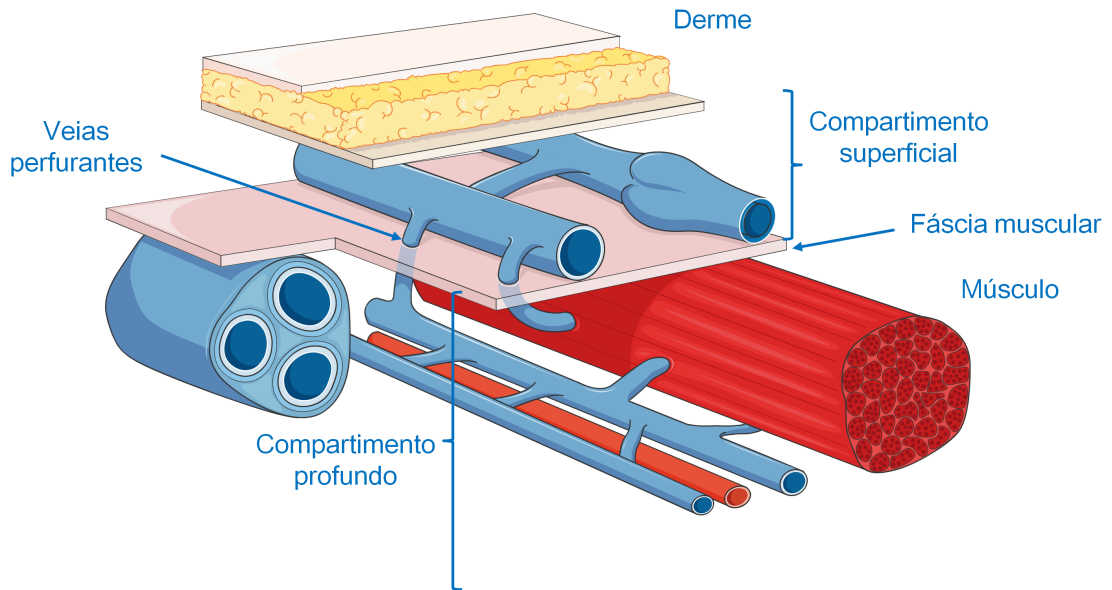


Figura 2 - Diagrama dos compartimentos do sistema venoso dos membros inferiores. Imagem adaptada com a autorização da *Servier medical art*[15].

As VGS e pequena safena recebem sangue proveniente do arco venoso dorsal do pé, através da veia marginal medial e lateral, respectivamente, ao nível da articulação talocrural. Também recebem sangue proveniente de veias tributárias superficiais que drenam os plexos subcapilares e reticulares da pele e os tecidos subcutâneos ao longo da perna e coxa[9, 13].

A VGS inicia-se anteriormente ao côndilo medial da tíbia, ascende na porção superficial medial da perna e coxa e penetra a fossa *ovalis*, a cerca de três centímetros inferior e lateralmente ao tubérculo púbico, para confluir na veia femoral comum (junção safenofemoral). Veias safenas acessórias são comuns e correm, quer na perna quer na coxa, em sentido ascendente de forma paralela, anterior ou posterior à VGS (cf. figura 3). O nervo safeno surge normalmente em relação muito próxima com a VGS nos dois terços distais da perna[9, 13].

A veia pequena safena inicia-se ao nível da porção lateral ou externa do tendão de Aquiles, na região mais distal da perna. Corre de forma ascendente na região subcutânea nos dois terços distais da perna, junto com o nervo sural, e penetra depois a fáscia, correndo entre os dois músculos gastrocnêmios. Ao nível da fossa poplíteia, a cerca de cinco centímetros acima do joelho, a veia pequena safena drena para o sistema venoso profundo na veia poplíteia. Ocorre frequentemente uma extensão cranial da veia pequena safena, que corre de forma ascendente e pode comunicar com a VGS na coxa (veia intersafena ou de *Giacomini*)[9, 13].

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

Podem existir até cerca de 150 veias perfurantes no membro inferior. Apesar deste facto, só algumas apresentam interesse clínico. Estas incluem as veias perfurantes mediais da perna, nomeadamente as veias perfurantes tibiais posteriores (inferiores, médias e superiores, ou também denominadas de *Cockett I, II e III*), que fazem a ligação entre a VGS acessória posterior da perna e as veias tibiais posteriores. Estas veias perfurantes, no caso de se tornarem insuficientes, contribuem de forma substancial para a hipertensão venosa crónica na perna, que pode originar alterações tróficas da pele e, inclusivamente, úlceras venosas[9, 13].

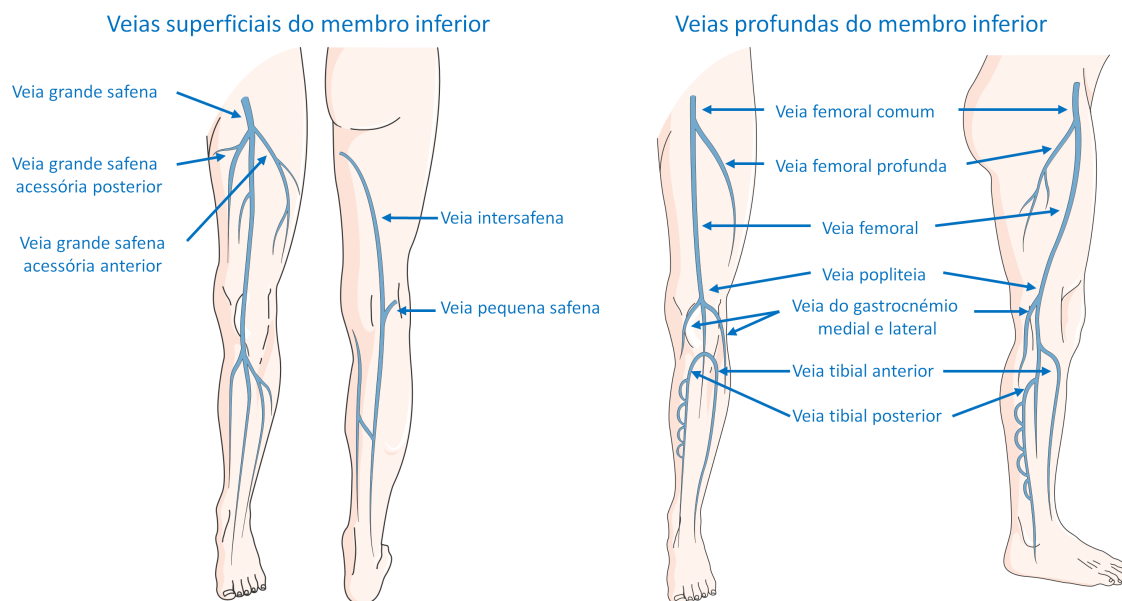


Figura 3 - Anatomia do sistema venoso superficial e profundo do membro inferior. Imagem adaptada com a autorização da *Servier medical art*[15].

1.1.4 Fisiologia

Para compreender a patologia do sistema venoso é pertinente mencionar alguns conceitos relativos à fisiologia deste sistema. Interessa referir que cerca de 60-70% do sangue do organismo está presente, em cada momento, no sistema venoso e que uma grande percentagem deste sangue se encontra em vénulas (veias com diâmetro inferior a 1mm)[9]. Apesar da pressão que o sangue exerce na parede arterial ser maioritariamente dependente da contração cardíaca, bem como da contração dos vasos arteriais, a pressão venosa é influenciada substancialmente pela força da gravidade. Uma simples mudança da posição supina para ortostática pode ser responsável por um aumento de 10% do volume sanguíneo nas veias dos membros inferiores[21]. Este é um conceito importante na medida em que permite perceber a alternância de pressão venosa dependendo da posição que o corpo adota, sendo que em ortostatismo, em cada localização anatómica, a pressão venosa é dependente do peso da coluna de sangue que se localiza imediatamente acima[9]. Ainda que exista um sistema valvular nas veias mais periféricas, como nos membros inferiores, que fragmenta a coluna de sangue e assim lhe diminui o peso, as veias cava e ilíacas não possuem válvulas e

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador- β 1 na doença venosa crônica dos membros inferiores

por isso transferem todo o peso do sangue que albergam para o sistema venoso inferior[20]. Esta é a razão pela qual ocorre uma acumulação de sangue venoso nos membros inferiores na posição ortostática. É para contrariar esta acumulação que as veias do sistema venoso dos membros inferiores apresentam as válvulas, que integram um sistema propulsivo na perna que auxilia a subida do sangue em direção ao coração[9, 20].

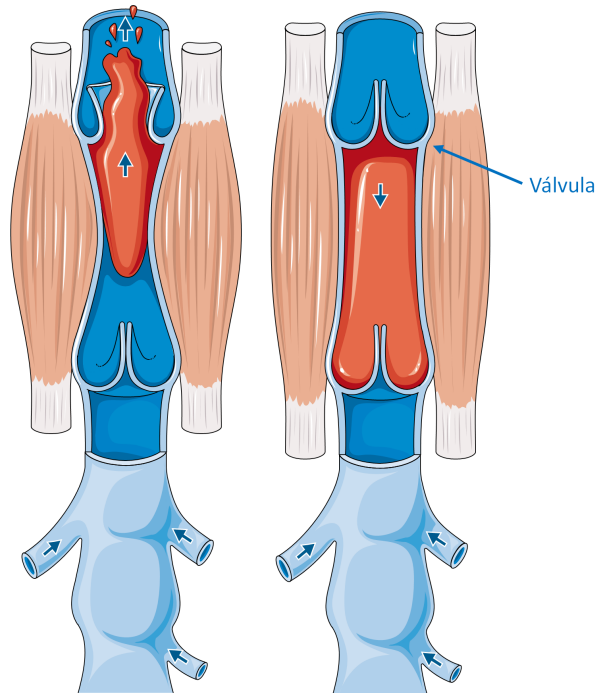


Figura 4 - Diagrama do processo de retorno venoso nos membros inferiores, dependente da bomba muscular. Imagem adaptada com a autorização da *Servier medical art*[15].

Estas válvulas abrem com a passagem do sangue no sentido ascendente, devido à compressão extrínseca dos vasos por parte dos músculos da perna, localizados dentro duma loca limitada por uma aponevrose inextensível[20], e encerram-se quando ocorre uma reversão do fluxo sanguíneo de cerca de 30cm/s, quando os músculos deixam de comprimir as veias, impedindo o seu refluxo no sentido distal (cf. figura 4). Desta forma, impossibilitam que o sangue enviado no sentido ascendente retorne às regiões mais inferiores, desde que a pressão exercida nas válvulas seja inferior a 300mmHg. O sistema propulsivo da perna, para além das válvulas venosas, mas incluindo-as, compreende a "bomba venosa da perna" que sustenta um fenómeno de bomba aspirante-premente na qual a contração muscular ejeta o sangue no sentido do coração e o relaxamento muscular permite uma redução da pressão dentro da loca aponevrótica e aspira o sangue para dentro da "bomba"[20]. É por esta razão que a deambulação, que origina a contração e relaxamento continuados e rítmicos dos músculos das pernas, promove o retorno venoso ao coração[9].

1.1.5 Fisiopatologia

Quando ocorre uma insuficiência valvular no sistema venoso, o retorno venoso ao coração é prejudicado. As válvulas tornam-se incapazes de impedir o refluxo em sentido distal, após a

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crônica dos membros inferiores

contração muscular extrínseca, e de orientar o fluxo exclusivamente no sentido proximal. Esta incompetência das válvulas permite que o sangue, enviado no sentido anterógrado com a compressão muscular, adote um movimento retrógrado e tenda a acumular-se nas regiões mais inferiores do sistema venoso, sobretudo quando a compressão muscular extrínseca é suspensa.

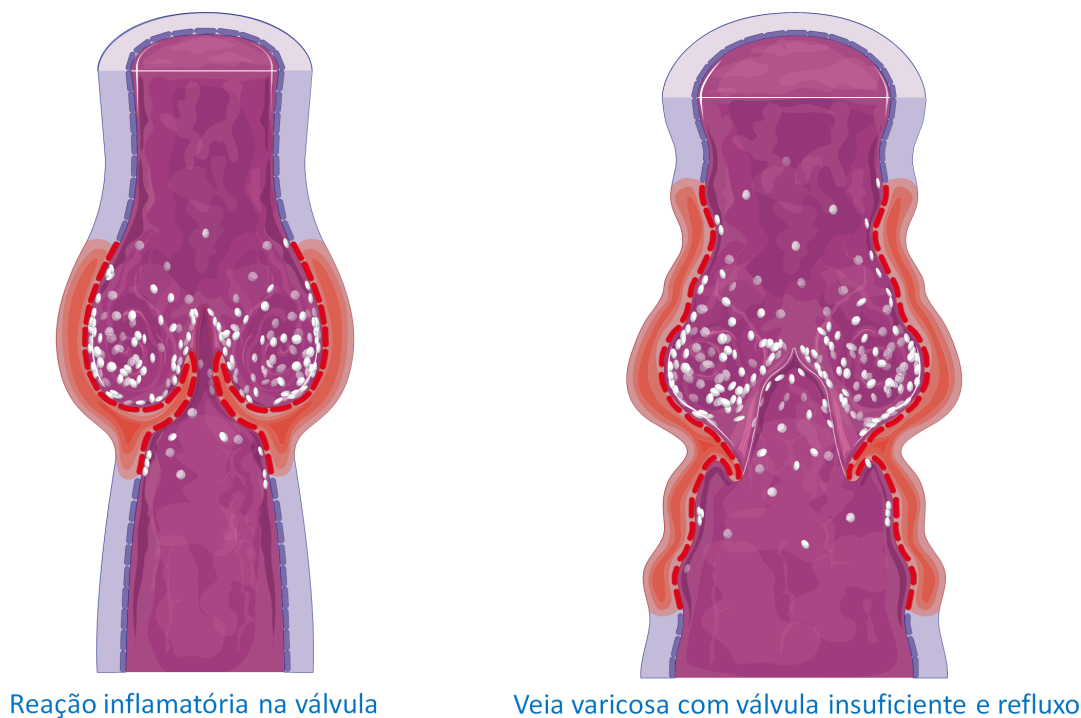


Figura 5 - Inflamação local na parede venosa dá origem a insuficiência valvular e refluxo venoso. Imagem adaptada com a autorização da *Servier medical art*[15].

O processo pelo qual ocorre esta disfunção valvular venosa não é ainda conhecido na sua totalidade, no entanto sabe-se que a lesão direta da veia por trauma, tromboembolismo com posterior recanalização, ou qualquer outro fenómeno que origine uma reação inflamatória na parede venosa, a pode despoletar (cf. figura 5). A acumulação sanguínea no lúmen venoso e o incremento da pressão venosa (originados pelas válvulas incompetentes e refluxivas) aumentam o diâmetro venoso, diminuem a velocidade circulatória e despoletam inflamação local e novo processo de lesão valvular, originando um fenómeno cíclico[20, 22]. Este, se mantido de forma crónica, pode originar edema, desconforto dos membros inferiores e alterações da microvascularização dos tecidos, com alterações da cor da pele, lipodermatoesclerose e até ulceração cutânea[4, 9, 23]. As veias mais superficiais ingurgitadas, pela sua condição anatómica extrafascial, não são suportadas a não ser pela pele e tecido celular subcutâneo, pelo que poderão tornar-se dilatadas e tortuosas, o que pode ser constatado através do exame clínico[20].

1.2 Características gerais da doença venosa crónica dos membros inferiores

A DVeC caracteriza-se pela existência de alterações morfológicas ou funcionais anormais do sistema venoso, que se manifestam por sinais ou sintomas que se mantêm por um longo período e que indicam a necessidade de investigação ou de cuidados. Esta inclui os sinais mais iniciais da doença, como por exemplo as telangiectasias ou as veias reticulares, mas também a denominada insuficiência venosa crónica, que se caracteriza por alterações da pigmentação cutânea, lipodermatoesclerose, processos cicatriciais cutâneos dependentes de ulceração prévia ou processos ativos de ulceração cutânea[24]. Este processo crónico advém do ciclo patológico causado pela debilitação e inflamação local da parede das veias, incluindo das suas válvulas, que provoca dilatação venosa, redução da velocidade circulatória e aumento da pressão luminal das veias e, deste modo, despoleta um novo processo inflamatório. A fisiopatologia deste processo ainda não é totalmente conhecida, no entanto existem vários estudos que indicam que deverá ser dependente da ativação leucocitária, de citocinas, de fatores de crescimento e de metaloproteinases da matriz (MMP), podendo estes estar na origem das alterações na estrutura da MEC da parede venosa[23].

1.2.1 Definições e classificação da doença venosa crónica

Com o intuito de objetivar com rigor os estádios da doença venosa em contexto clínico e científico, foi desenvolvida pela *American Venous Forum* uma classificação denominada **CEAP** (cf. tabela 1), que inclui manifestações clínicas (C), fatores etiológicos (E), distribuição anatómica (A) e fisiopatologia (P)[25].

Tabela 1 - Classificação clínica CEAP para a doença venosa crónica dos membros inferiores.

C0	Não são visíveis sinais de doença venosa
C1	Telangiectasias e/ou veias reticulares
C2	Veias varicosas (≤ 3 mm de diâmetro)
C3	Edema
C4	C4a Pigmentação cutânea ou eczema
	C4b Lipodermatoesclerose e/ou atrofia branca
C5	Úlcera venosa cicatrizada
C6	Úlcera venosa ativa
S	Sintomático
A	Assintomático

Esta classificação define todas as formas de doença venosa, sendo que o termo "doença venosa crónica" inclui a totalidade do espectro de alterações morfológicas e funcionais do

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crônica dos membros inferiores

sistema venoso, que vai desde as telangiectasias até às úlceras venosas. Por outro lado, o termo "insuficiência venosa crônica" é referente aos estádios mais avançados da DVeC, que incluem complicações como edema, alterações cutâneas e úlceras venosas.

É importante apresentar a definição de alguns termos presentes nesta classificação (cf. figura 6):

Telangiectasias: vénulas intradérmicas dilatadas e confluentes com menos de 1mm de diâmetro.

Veias reticulares: veias subdérmicas dilatadas e tortuosas com diâmetro compreendido entre 1 e 3mm.

Veias varicosas: veias subcutâneas dilatadas e tortuosas com diâmetro superior a 3mm, especialmente visíveis quando se adota uma posição ortostática.

Edema: aumento de volume de fluido na pele e tecido celular subcutâneo (espaço intersticial), caracterizado pela deformação após pressão.

Pigmentação cutânea: coloração acastanhada ou ocre, da pele, resultado da deposição de hemossiderina no espaço extracelular.

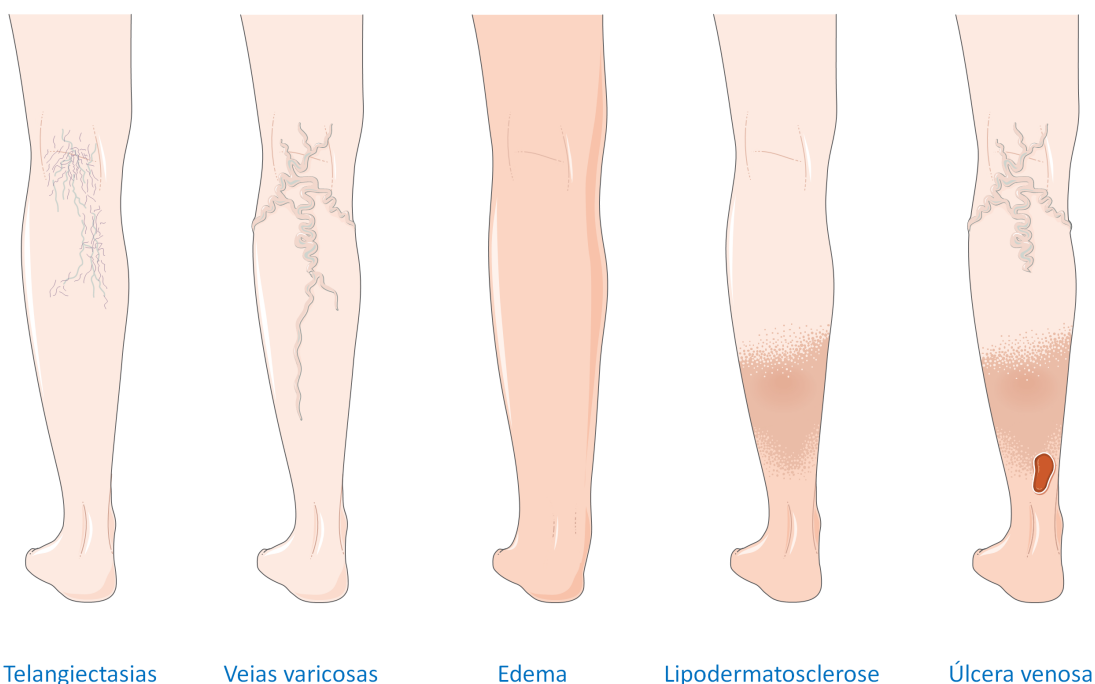


Figura 6 - Espectro de alterações morfológicas e funcionais do sistema venoso dos membros inferiores, que vai desde as telangiectasias até às úlceras venosas. Imagem adaptada com a autorização da *Servier medical art*[15].

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador- β 1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

Eczema varicoso: dermatite eritematosa que pode progredir para vesículas pruriginosas ou para erupções da pele, em forma de escamas.

Lipodermatoesclerose: inflamação e fibrose crónica localizada da pele e tecido celular subcutâneo, que pode incluir um processo cicatricial subcutâneo.

Atrofia branca: atrofia cutânea esbranquiçada e localizada, que normalmente é rodeada por pigmentação ocre.

Úlcera venosa: Solução de continuidade da pele e tecido celular subcutâneo, sem interessar a aponevrose.

As classificações etiológica, anatômica e fisiopatológica, não serão abordadas no contexto desta tese, no entanto podem ser consultadas na publicação que resultou do consenso de revisão da classificação em 2004[25].

1.2.2 Etiologia e fatores de risco

A etiologia da DVeC ainda não foi totalmente esclarecida, no entanto assume-se que há uma grande probabilidade de ser multifatorial. Significa isto que fatores ambientais e genéticos poderão ser intervenientes importantes no processo fisiopatológico. De acordo com diferentes estudos, são considerados fatores predisponentes prováveis para a doença: a posição ortostática ou sentada prolongada[2, 3, 26-28] que, pela força da gravidade, dificulta o retorno venoso ao coração; a história familiar de doença venosa crónica[2, 3, 26-28], demonstrando-se a importante intervenção genética na doença; a idade avançada[2, 3, 29-31] (muito provavelmente os processos de homeostasia da matriz extracelular tornam-se mais ineficientes com o avançar da idade); o género feminino[2, 3, 29]; o uso de contraceção química ou terapia com estrogénios[29, 31-33] e a gravidez[2, 3, 33, 34], indicando a importante intervenção hormonal no processo patológico; a obesidade que, muito provavelmente, se associa à diminuição da atividade física e portanto à dificuldade no retorno venoso ao coração; o trauma prévio dos membros inferiores e o tromboembolismo[2, 23, 26, 28, 34], que são fatores predisponentes de processos inflamatórios e por isso a alterações da matriz extracelular da parede venosa. Estes fatores predisponentes são reconhecidos, contudo, a verdadeira causa da doença escapa ainda ao conhecimento da comunidade científica.

1.2.3 Epidemiologia

A DVeC é bastante prevalente, sendo estimado que afete cerca de 5-30% da população mundial, apesar de terem sido publicados estudos que demonstraram uma variação entre 1% e 70%[2-4]. Um estudo com 91.000 sujeitos de todo o mundo demonstrou que 63.9% dos indivíduos apresentavam fenómenos que se englobavam no espectro patológico alargado da

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

DVeC[35]. A incidência mundial de varizes propriamente ditas será de cerca de 25-33% em mulheres e de 10-20% em homens adultos, sendo que esta aumenta e tende a igualar-se nos dois sexos, com o avançar da idade[22, 36]. No entanto, os estádios mais avançados da doença (CEAP 5 e 6) apresentam uma prevalência estimada de 1-2% da população[4, 22]. A alta incidência e prevalência, assim como o seu impacto a nível social e económico, nomeadamente no uso considerável de recursos de saúde, revelam a necessidade premente de desenvolver novas formas de tratamento[37].

Estudos epidemiológicos demonstraram que a doença venosa é bastante mais prevalente em países industrializados do que em países em vias de desenvolvimento[26, 29]. Em Portugal cerca de um terço da população apresenta sinais de DVeC, incluindo 34,1% da população feminina e 17,8% da população masculina que apresenta, inclusivamente, sinais de insuficiência venosa crónica, sendo que estes números acarretam um impacto socioeconómico considerável[22]. Por exemplo, cerca de 8% dos doentes com DVeC reformam-se antecipadamente devido à doença e existe uma diminuição considerável da qualidade de vida associada a ela, sendo que 48% das pessoas sofre de dor nas pernas e 64% da população feminina, com mais de 50 anos, refere diminuição importante da qualidade de vida[8]. Estes factos são suficientes para perceber que esta patologia, ainda que não letal, merece atenção e investimento da comunidade científica.

1.3 Alterações primárias da parede vascular na doença venosa crónica

As veias, contrariamente às artérias, possuem uma parede fina com uma camada muscular bastante reduzida e representam um sistema de baixa pressão no retorno venoso da periferia para o coração. As veias periféricas, como já referido, apresentam válvulas que evitam o refluxo venoso e permitem o normal fluxo anterógrado do sangue no sentido cardíaco. O *primum movens* da DVeC, ou seja a razão pela qual surge a hipertensão venosa inicial, ainda é desconhecido. O processo poderá iniciar-se diretamente na parede da veia. Em alguns indivíduos podem ocorrer alterações estruturais da parede venosa dos membros inferiores que a enfraquecem e que, com a posição ortostática e a pressão aumentada sobre a parede das veias, levam à sua dilatação, originam o afastamento valvular, a estase e a insuficiência venosa. O refluxo valvular sanguíneo poderá, então, aumentar a pressão endoluminal, num sistema que é unicamente apto para baixas pressões, e expor a parede venosa a ainda maior tensão, criando condições para um processo patológico cíclico e crónico[23, 38]. No entanto, fica por explicar por que razão esse processo ocorre unicamente nas veias dos membros inferiores. Outra hipótese avançada para explicar o fenómeno fisiopatológico é a alteração da homeostase endoluminal. Pode ocorrer, segundo o equilíbrio de Starling, um aumento da filtração capilar causado pela estase venosa e pela diminuição da pressão de cisalhamento,

que pode despoletar a adesão leucocitária, a sua penetração transcapilar e fenómenos precoces de inflamação[23, 39, 40]. Esta inflamação local pode, depois, originar alterações estruturais da parede vascular que iniciam o processo de dilatação venosa, afastamento das valvas venosas e consequente insuficiência. Nesta última hipótese fica também por explicar a razão da estase venosa inicial e por que esta despoleta fenómenos inflamatórios unicamente em determinados indivíduos. Apesar de tudo, sabe-se que com a evolução da doença, os ciclos contínuos de alterações moleculares e dilatação da parede venosa podem precipitar um espectro de fenómenos que poderá ir desde o edema dos membros inferiores até à ulceração cutânea[16].

A aparência organizada das diferentes túnicas da parede venosa normal perde-se nas veias varicosas, surgindo também uma deposição desordenada de fibras de colagénio[17, 23, 41], particularmente na túnica média. Ocorre um aumento difuso da espessura da túnica íntima e as células musculares lisas surgem com uma forma elíptica, fenótipo mais comum nas células secretoras, em detrimento da conformação fusiforme normal, fenótipo contráctil[42]. Surge uma transformação celular de endotélio para mesenquima, com produção de miofibroblastos. Na túnica adventícia podem ainda ser observadas áreas de atrofia, com ausência de *vasa vasorum*. A deposição alterada de colagénio é também acompanhada de uma diminuição na quantidade de elastina, componente da matriz que confere elasticidade aos tecidos e o retorno à forma inicial após estes serem deformados por diferentes tensões[43]. Estas alterações da MEC devem-se, muito provavelmente, às variações na expressão e atividade das MMP e aos efeitos proteolíticos subsequentes[16]. O processo pelo qual ocorre a desregulação destas proteínas ainda não foi totalmente desvendado, existindo no entanto várias teorias para este fenómeno, que apresentam como denominador comum a ativação leucocitária-endotelial[37, 44-53], na qual, na presença de qualquer fator precipitante, ocorre a ativação endotelial, a expressão de diferentes fatores de crescimento e moléculas de adesão ou de sinalização, que podem modificar o microambiente local e levar à disfunção endotelial e ao recrutamento leucocitário e macrofágico. Não obstante e de um modo geral, aceita-se que uma veia varicosa perde a sua capacidade contráctil e tem destruídas as válvulas da parede. Estes processos tornam a veia mais exposta às variações de pressão endoluminal, causadas pelas modificações posturais do corpo e pelo efeito da força da gravidade na coluna de fluido constituída pelo sangue venoso.

1.3.1 Remodelação da matriz extracelular da parede vascular

A MEC é uma estrutura em constante remodelação que mantém as células de um tecido organizadas e coesas, e permite diferentes interações entre essas mesmas células. É constituída basicamente por três grandes grupos de componentes: fibras (p.e., colagénio, elastina, laminina, vitronectina, tenascina e fibronectina), proteoglicanos (p.e., sindecán-1) e polissacarídeos (p.e., ácido hialurónico)[54]. No caso da parede vascular, a MEC possui

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador- β 1 na doença venosa crônica dos membros inferiores

funções de suporte da estrutura, conferindo as características elásticas e de resistência à tensão na parede vascular[55].

Os tipos de colagénio mais frequentes na parede vascular são o I e III, sendo que o tipo I confere preferencialmente um efeito contrário à força de tensão na parede vascular e o tipo III confere um efeito elástico. A alteração do rácio tipo I/III pode contribuir para as alterações funcionais das veias varicosas[56].

Sempre que as paredes das veias são sujeitas a stress (causado pela turbulência do fluido que contém ou por um aumento de pressão), podem ocorrer lesões endoteliais e/ou fenómenos de hipoxia da parede venosa (através do influxo celular de cálcio, ou da interação com integrinas membranares, que originam a expressão de fatores induzidos por hipoxia – *hypoxia-inducible factors* ou HIF) que ativam a migração de células leucocitárias e mastócitos para o espaço extracelular e a secreção de proteases e glicosidases[23]. Estas podem, por seu turno, ativar diferentes fatores de crescimento ou citocinas (p.e., fator transformador de crescimento- β 1, fator de crescimento endotelial vascular, fator de necrose tumoral- α ou interleucinas) que intervêm direta ou indiretamente na regulação de MMP e inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP) e, conseqüentemente, na remodelação da MEC. Quando as MMP se sobrepõem aos TIMP, pode ocorrer a destruição da matriz, originando segmentos atroficos; no caso da sobreposição se inverter, pode dar-se a deposição da matriz, surgindo segmentos esclerosados[4, 23, 39, 50].

1.3.2 Metaloproteinases e seus inibidores tecidulares

As MMP constituem uma família de endoproteases dependentes do zinco (matrixinas) que pertencem à superfamília das metzincinas e que possuem variadas funções, nomeadamente na remodelação tecidual, degradação de proteínas da MEC, promoção da proliferação e migração celular, angiogénese, resposta imune e na modulação de vias de sinalização celular[54]. A sua expressão e atividade podem alterar-se em determinados processos fisiológicos, como a cicatrização de feridas e a gravidez, assim como em processos patológicos, como por exemplo a aterosclerose, os aneurismas vasculares, as veias varicosas, a osteoartrite e as neoplasias[54].

Já foram identificadas, pelo menos, 23 tipos de MMP em tecidos humanos, 16 dos quais em tecidos vasculares (MMP1, 2, 3, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 18, 19, 26, 27, 28)[54, 57]. As MMP são sintetizadas e segregadas por células de tecidos conjuntivos (p.e., fibroblastos, osteoblastos, plaquetas, células endoteliais e células musculares lisas), células pró-inflamatórias (p.e., macrófagos, neutrófilos e linfócitos) e células uteroplacentares (p.e., citotrofoblastos)[54, 57]. Pelo papel que desempenham na MEC, as MMP são frequentemente encontradas em tecidos conjuntivos, sendo também muito comuns em tecidos específicos, como por exemplo o tecido vascular[58].

As metaloproteínas, os inibidores tecidulares de metaloproteínas e o fator de crescimento transformador- β 1 na doença venosa crônica dos membros inferiores

A atividade de MMP específicas pode variar durante o curso da DVeC, uma vez que a sua atividade proteolítica pode ser diferente em substratos diferentes, podendo também estes sofrer mudanças durante o curso da patologia[54]. Por esta razão, no contexto da investigação laboratorial sobre a atuação destas endoproteases em processos fisiopatológicos, é importante avaliar diferentes MMP e TIMP em localizações anatómicas distintas do mesmo tipo de tecido, bem como em estádios de doença diferentes[54].

1.3.2.1 Estrutura das metaloproteínas

As MMP partilham uma estrutura comum composta por um pro-peptídeo de 80 aminoácidos, um domínio catalítico de 170 aminoácidos, um peptídeo de interligação (*hinger region*) de tamanho variado e um domínio tipo hemopexina de 200 aminoácidos (cf. figura 7)[57, 59, 60].

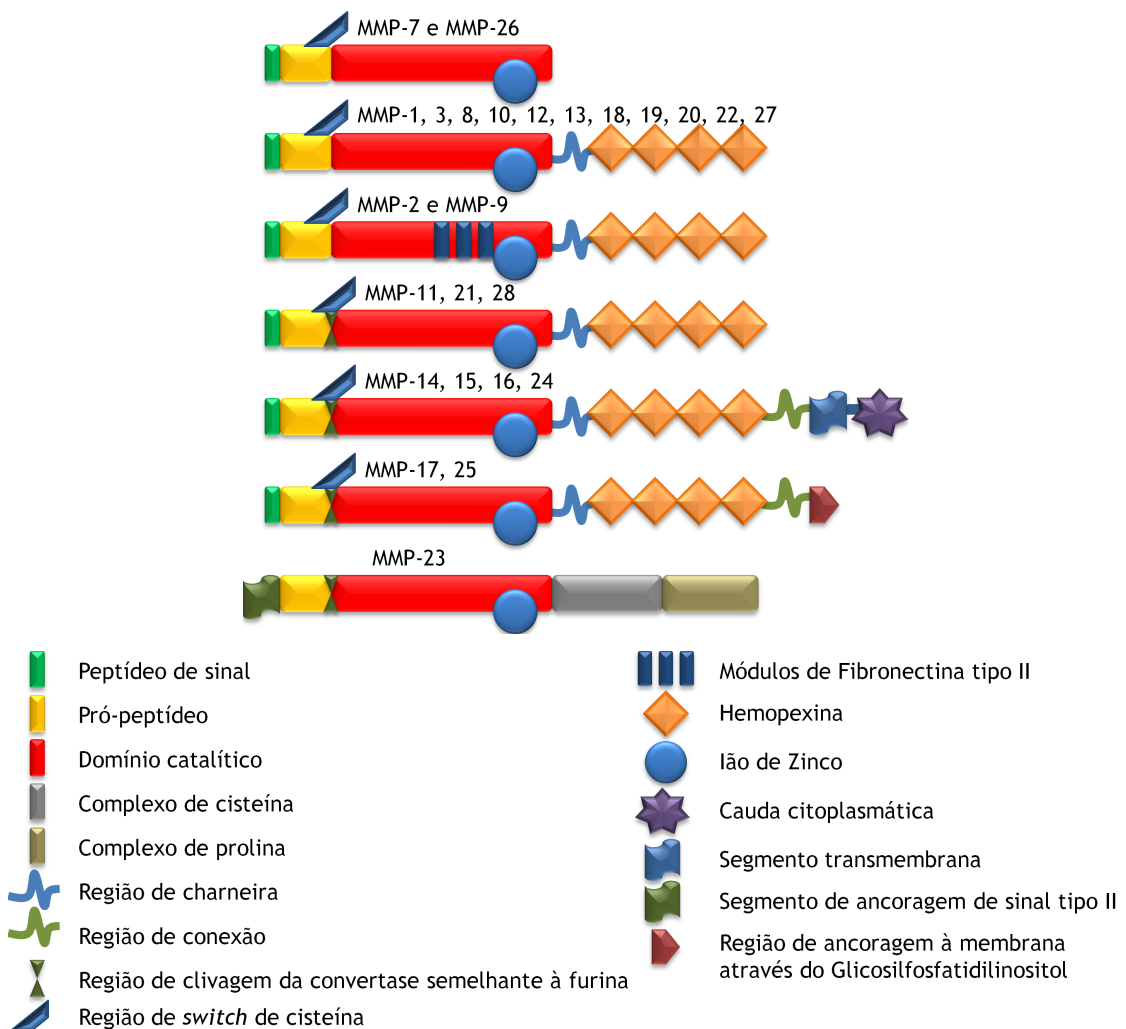


Figura 7 - Diagrama da estrutura das principais metaloproteínas.

Para além da estrutura comum, também são partilhadas algumas características como a semelhança estrutural à colagenase-1 (MMP1), a existência de um grupo cisteína sulfidril que inativa o local de ligação ao zinco (mantendo a MMP no seu estado inativo de pro-MMP), e a

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crônica dos membros inferiores

existência de um domínio catalítico que se liga ao zinco através de três histidinas. Note-se, contudo, que algumas MMP (MMP7, 23 e 26) não possuem peptídeo de interligação, nem domínio tipo hemopexina, sendo as exceções nesta família[23, 57, 59, 60]. Existem outras peculiaridades dignas de nota como, por exemplo: algumas MMP (MMP11, 14, 15, 16, 17, 21, 23, 24 e 25) (cf. figura 7) apresentam regiões de clivagem da convertase semelhantes à furina inseridas no pro-peptídeo (o que lhes permite uma ativação intracelular por intermédio da furina, uma pro-proteína convertase, sendo depois expressas na superfície celular, originando a clivagem e ativação de outras pro-MMP); as MMP17 e 25 apresentam uma região de ancoragem à membrana celular distinta, através de um glicosilfosfatidilinositol (o que lhes permite uma atividade proteolítica na superfície celular, no entanto impossibilita a regulação da pro-MMP2); e as MMP2 e 9 apresentam três módulos de fibronectina tipo II inseridos no pro-peptídeo (conferindo-lhe a capacidade de ligação não só a gelatinas, mas também ao colagénio e à laminina[54, 57]).

1.3.2.2 Tipos específicos de metaloproteinases e Inibidores de metaloproteinases.

Tendo em consideração a sua organização estrutural e substrato, as MMP podem ser classificadas como: collagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinases, MMP de membrana (MT-MMP) e “outras MMP”[54].

Collagenases

Incluem a MMP1, 8, 13 e 18, e apresentam um papel importante na clivagem de colagénio intersticial[54]. As MMP1, 13 e 18 já foram identificadas em tecidos vasculares, sendo associadas à aterosclerose, aneurismas e ao enfarte do miocárdio[54, 57].

Gelatinases

Incluem a MMP2 (gelatinase A) e a MMP9 (gelatinase B). Estas distinguem-se das restantes na medida em que apresentam um domínio de ligação ao colagénio distinto (três repetições de fibronectina tipo II), presente no domínio catalítico[23, 57]. Por essa razão, possuem a capacidade de clivar fibras de colagénio desnaturado (também denominadas de gelatinas)[57]. As duas gelatinases foram anteriormente identificadas em tecidos vasculares e foram relacionadas com a DVeC, a aterosclerose e com aneurismas[54, 57].

Estromelisinases

Incluem a MMP3, 10 e 11 (estromelisinase 1, 2 e 3, respetivamente) e possuem uma estrutura semelhante às collagenases. No entanto não apresentam a capacidade de clivar o colagénio intersticial. As MMP3 e 10 também intervêm na ativação de pro-MMP[54]. As três estromelisinases foram anteriormente identificadas em tecidos vasculares e foram relacionadas com úlceras venosas, a aterosclerose, aneurismas e com a angiogénese[54, 57].

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

Matrilisinas

Incluem a MMP7 e 26 e caracterizam-se por não possuírem nem domínio tipo hemopexina, nem região de interligação na sua estrutura[54]. As duas matrilisinas já foram identificadas em tecidos vasculares e foram relacionadas com úlceras venosas, a aterosclerose, aneurismas e com o enfarte do miocárdio[54, 57].

MT- MMP

Incluem a MMP14, 15, 16, 17, 24 e 25, e caracterizam-se por apresentarem uma sequência de reconhecimento de uma convertase semelhante à furina. São ativadas no espaço intracelular e expressas posteriormente na superfície celular, apresentando um domínio de ancoragem à membrana[57]. Tal como as estromelinas 1 e 2, estas MMP podem ativar pro-MMP[61, 62]. Neste grupo só as MMP14 e 16 foram até agora identificadas em tecidos vasculares e foram associadas à angiogénese, à aterosclerose, aneurismas e ao enfarte do miocárdio[54, 57].

Outras MMP

Incluem a MMP12, 19, 20, 21, 22, 23, 27 e 28. Estas MMP não possuem características específicas para que possam ser incluídas nos grupos anteriormente apresentados[54]. Entre estas, somente as MMP12, 19, 27 e 28 foram até agora identificadas em tecidos vasculares e foram relacionadas com a aterosclerose, a angiogénese, aneurismas e com o enfarte do miocárdio [54, 57].

Inibidores de metaloproteinases

Os TIMP são um grupo de quatro inibidores endógenos de MMP que se ligam a estas numa relação 1:1[63, 64]. Os TIMP1 e TIMP3 são glicoproteínas, enquanto os TIMP2 e TIMP4 não incluem carboidratos. Todos possuem um domínio N-terminal e outro C-terminal com três ligações dissulfido conservadas. É o domínio N-terminal que de facto inibe as MMP, ocupando o seu local de ativação de forma semelhante à do substrato[57, 63, 64]. Os TIMP não possuem especificidade para MMP particulares e inibem-nas com diferentes eficácias[63-67].

1.3.2.3 Ativação das metaloproteinases

A atividade das MMP pode ser regulada de diferentes formas: pela sua expressão genética, pela ativação da pro-enzima ou pela inibição direta por TIMP (cf. figura 8). As MMP são sintetizadas como pro-MMP em zimogénios, nas quais um grupo cisteína sulfidril interage com o domínio catalítico de zinco, mantendo a pro-MMP inativa. No caso da cisteína ser clivada, o pro-domínio é exposto e libertado por proteases de serina, endopeptidase furina, plasmina ou por outras MMP, originando a ativação da MMP[57, 59].

Os TIMP, para além do papel inibitório que têm nas MMP, também podem, paradoxalmente, apresentar um papel facilitador na ativação de certas MMP (MMP2 e 9), através da ligação do seu domínio C-terminal ao domínio C-terminal da hemopexina nas MMP[68-70]. Para isso, os TIMP formam um complexo com a pro-MMP, ligando-se ao seu domínio tipo

As metaloproteinasas, os inibidores tecidulares de metaloproteinasas e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

hemopexina, e de seguida a uma MT-MMP. Este novo complexo MMP/TIMP/MT-MMP poderá então facilitar a clivagem de cisteína e a ativação da MMP[71-74].

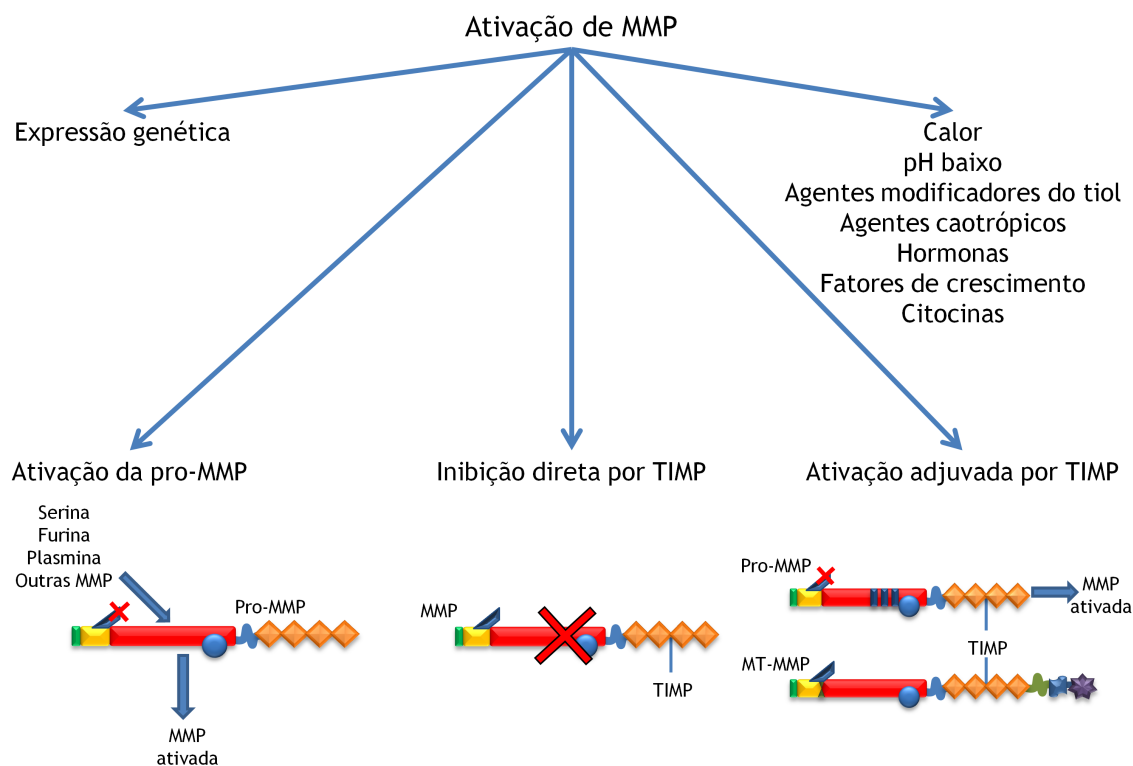


Figura 8 - Diagrama da ativação das metaloproteinasas.

As MMP podem também ser ativadas por outros fatores como, por exemplo, calor, pH baixo, agentes modificadores do tiol (p.e., cloreto de mercúrio, glutatona oxidada), plasmina e agentes caotrópicos, que podem originar a quebra da coordenação cisteína-zinco na região *switch* de cisteína da molécula de MMP. As MMP também podem funcionar como fator de ativação de outras MMP, através da clivagem do seu complexo de cisteína[54]. Outros agentes como hormonas, fatores de crescimento (p.e., TGF- β) e citocinas (p.e., fator de necrose tumoral- α , interleucina-1) também podem influenciar a expressão e a atividade das MMP através da influência na sua secreção por células pró-inflamatórias[57, 59].

1.3.2.4 Os substratos das metaloproteinasas

As MMP têm um papel extremamente importante na remodelação tecidual promovendo o *turnover* de várias moléculas da MEC (p.e., colagénio, elastina, fibronectina, laminina, agreganos, entactina e tenascina). O colagénio e a elastina da MEC são, como referido anteriormente, essenciais para a integridade da parede vascular, podendo a atividade das MMP condicionar fenómenos patológicos neste tipo de tecidos. O domínio tipo hemopexina das MMP é essencial no reconhecimento e degradação catalítica dos substratos, conferindo a especificidade de cada MMP para os mesmos[75, 76].

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador- β 1 na doença venosa crônica dos membros inferiores

Para além da sua ação na MEC vascular, as MMP também intervêm em vários processos fisiológicos como, por exemplo: apoptose, angiogénese, ciclo endometrial, desenvolvimento embrionário, remodelação óssea, resposta imune (participando na regulação da ativação ou libertação de citocinas, quimiocinas ou fatores de crescimento) e processo cicatricial de lesões teciduais[57, 59, 77].

1.3.2.5 Níveis de metaloproteinases em veias varicosas primárias

A desregulação de MMP na DVeC já foi demonstrada[17]. Alguns autores sugeriram recentemente que fatores genéticos, ambientais e comportamentais poderiam originar um aumento da pressão hidrostática nas veias dos membros inferiores, o que levaria ao aumento da tensão da parede venosa e despoletaria a lesão endotelial, o aumento da permeabilidade endotelial e a infiltração leucocitária originando um aumento local das MMP[23]. Estas poderiam aumentar o relaxamento da parede venosa e a degradação da MEC levando à dilatação das veias e à disfunção valvular. Outros autores propuseram a existência de uma via anti-inflamatória compensatória, que através de prostaglandinas e dos seus recetores, diminuiria as MMP e dessa forma aumentaria a deposição de MEC[23]. No entanto, diferentes estudos revelaram grandes disparidades de resultados na expressão e atividade de MMP em veias varicosas[55]. Foi demonstrado um aumento dos níveis de expressão de MMP1, 2, 3 e 7, assim como um aumento de atividade de MMP2, em veias varicosas[18]. Também foi demonstrada a existência de uma elevação dos níveis plasmáticos de MMP10 e da atividade do inibidor do ativador do plasminogénio-1 (PAI-1) em doentes com veias varicosas primárias, sugerindo-se que algumas MMP poderiam ter um efeito pró-inflamatório[78]. Um outro estudo demonstrou um aumento dos níveis proteicos de MMP1 e MMP13 em segmentos proximais de veias varicosas, quando comparados com segmentos distais, sugerindo que o aumento dos níveis de MMP poderia ser originado por alterações pós-transcricionais[79]. Foi também confirmado que os níveis proteicos de MMP variam entre as diferentes túnicas da parede de veias varicosas. Apesar disto, esta variação nem sempre se apresentou coincidente - por exemplo, num estudo foi demonstrado que a MMP1 podia ser localizada em fibroblastos, células musculares lisas vasculares (CMLV) e células endoteliais; a MMP9 em células endoteliais, CMLV e adventícia; e a MMP12 em fibroblastos e CMLV[52]. Não obstante, num estudo diferente a MMP1 encontrava-se expressa em todas as túnicas da parede venosa, enquanto a MMP9 só se encontrava expressa na íntima e na adventícia[80]. Foi também verificado que a MMP2 se apresentava em níveis elevados em todas as túnicas da parede, enquanto as MMP1, 3 e 7 só se encontravam elevadas na túnica íntima e média[18].

Não existe consenso em relação ao aumento da expressão de MMP em veias varicosas, na medida em que também se encontram publicados trabalhos que demonstraram níveis inalterados ou mesmo diminuídos de MMP na DVeC[81, 82]. Estas discrepâncias nos resultados dos vários estudos podem ser explicadas por diferenças metodológicas. Estas incluem, por exemplo, o estudo indiferenciado de segmentos de veia de regiões anatómicas distintas, não

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

tendo em consideração que regiões anatómicas diferentes poderão apresentar características também diferentes, como hipertrofia ou atrofia da parede. Outro exemplo é a utilização de segmentos de veia macroscopicamente não varicosa para amostras controlo, obtidos de doentes com insuficiência venosa. Um terceiro exemplo é o estudo de segmentos venosos sem serem considerados os diferentes estádios de doença.

1.3.2.6 Moduladores da expressão e atividade de metaloproteinases em veias varicosas

Pressão hidrostática venosa

Alguns estudos mostraram que um estiramento celular de origem mecânica pode gerar um aumento da expressão ou da atividade das MMP em células endoteliais, CMLV e fibroblastos da parede venosa[83, 84], assim como um estiramento mecânico direto na parede venosa pode levar ao aumento local da expressão de MMP2 e 9[23]. Estes estudos corroboram a ideia de que o incremento da pressão hidrostática venosa, ou seja, a tensão na parede venosa nos membros inferiores, originada por extensos períodos de imobilidade em ortostatismo, pode promover alterações de atividade e expressão de MMP na parede venosa, alterando o tónus e originando dilatações típicas encontradas em varicosidades[85].

Processo inflamatório

Já foi demonstrado que as alterações no fluxo sanguíneo podem originar processos inflamatórios locais na parede venosa[51]. Estes podem ser despoletados pela lesão direta de células endoteliais, dando origem a um aumento de permeabilidade endotelial e à ativação de moléculas de adesão leucocitária. Este processo pode então culminar na infiltração leucocitária através da parede vascular, no processo inflamatório local na parede da veia e no aumento da expressão e atividade de MMP[17, 39, 51, 86, 87].

Para além da infiltração leucocitária na parede venosa, foi também comprovada a infiltração de outras células intervenientes no processo inflamatório como, por exemplo, monócitos ou macrófagos[88, 89]. Em doentes com veias varicosas, foi observado um aumento da expressão de ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1) e de VCAM-1 (molécula de adesão celular vascular-1)[39, 86]. Foi também demonstrado um aumento dos níveis plasmáticos destas moléculas assim como da enzima conversora da angiotensina, da L-selectina e da pro-MMP9[39, 86]. As citocinas como a interleucina-17, interleucina-18 e uroquinase, através do aumento da expressão de fator de necrose tumoral- α , ou através do aumento de espécies reativas de oxigénio, podem também intervir na resposta inflamatória, aumentando a atividade de MMP9 na parede das veias[90-93].

Deste modo, é possível afirmar que o processo inflamatório na parede venosa pode dar origem ao aumento da expressão e da atividade de MMP que, por sua vez, despoletam a degradação da MEC e provocam a fraqueza da parede venosa, a dilatação e a atrofia do tecido, bem como

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador- β 1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

a disfunção valvular venosa. Todos estes processos podem originar o aumento da pressão hidrostática venosa nos membros inferiores, gerando um fenómeno cíclico que evolui no sentido crónico da doença[94].

Hipoxia

Os HIF podem intervir no processo de alteração molecular na parede venosa, por intermédio de alterações na pressão hidrostática. Aqueles são fatores transcricionais nucleares que regulam os genes envolvidos nos processos oxidativos e podem ser influenciados pelo estiramento mecânico celular[95]. Foram apresentadas evidências de que o estiramento de segmentos de veia cava inferior está associado a um aumento da expressão e dos níveis proteicos de MMP2, MMP9, HIF-1 α e HIF-2 α [23]. Foi igualmente demonstrado que o HIF-1 α pode regular a expressão de MMP2 e 9 em doentes com fístulas arteriovenosas[96] e que uma oferta tecidual baixa de oxigénio, pH baixo, citocinas, hormonas e um aumento de temperatura, podem influenciar a expressão de HIF e, por sua vez, a expressão e atividade de MMP[23].

Prostaglandina E2

A prostaglandina E2, que é produzida e segregada por diferentes tipos de células vasculares, pode, mediante a ativação do recetor EP4, diminuir a atividade de MMP1 e MMP2 e levar à deposição de colagénio, originando segmentos hipertróficos em veias varicosas[97].

1.3.2.7 Efeito das metaloproteinases e dos inibidores de metaloproteinases em veias varicosas

Efeito das MMP e dos TIMP na MEC

Alguns estudos revelaram alterações estruturais em veias varicosas ao nível do colagénio tipo I e tipo III, assim como da elastina, tenascina e laminina, quando comparadas com veias saudáveis, sendo sugerido que estas alterações se deviam a modificações da expressão e da atividade das MMP[60, 98-101]. Deste modo, é possível afirmar que modificações da atividade das MMP podem influenciar a composição da MEC e a estrutura e função das veias.

Apesar disto, como referido anteriormente, os resultados obtidos nos diversos estudos sobre a expressão e/ou a atividade de MMP em veias varicosas revelaram-se inconsistentes[55]. Para além das já mencionadas questões metodológicas, pode ainda acrescentar-se que as diferenças nos resultados podem estar relacionadas com as características da DVeC. Esta, durante a sua evolução natural, apresenta diferentes fases clínicas e anatomopatológicas, podendo surgir segmentos de veia atroficos e outros hipertróficos – note-se que este fenómeno pode, inclusivamente, ocorrer no mesmo período temporal. Tendo em consideração que as MMP degradam a MEC, é razoável sugerir que quando o rácio MMP/TIMP beneficia as MMP, a MEC apresenta um período especialmente importante de degradação e surgem segmentos venosos atroficos. Por oposição, quando o rácio beneficia os TIMP, surgem

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador- β 1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

segmentos hipertróficos[23]. Qualquer alteração estrutural da MEC da parede de uma veia saudável pode dar origem à insuficiência valvular e, conseqüentemente, ao círculo vicioso de aumento de pressão hidrostática que conduz a novas alterações estruturais na parede venosa.

Efeito das MMP no endotélio e no músculo liso vascular

As MMP (nomeadamente as MMP1, 2 e 9) participam no crescimento, na migração e na função contrátil de CMLV, e podem promover a sua interação com componentes da MEC[86, 102-104]. Estas alterações podem ter efeitos importantes na função da parede venosa, na medida em que as CMLV têm um papel importante no seu tónus. As MMP podem também induzir a libertação de fatores de crescimento, clivando as suas proteínas de ligação, e originar a hipertrofia das CMLV na parede venosa[105]. No entanto, é importante referir que, apesar das MMP possuírem a capacidade de despoletar a libertação de fatores de crescimento, são também reguladas por eles (p.e., pelo fator de crescimento derivado das plaquetas-BB)[106], tornando plausível o facto de poderem ser reguladas pelo TGF- β 1, como será referido posteriormente.

As MMP podem interferir diretamente nos mecanismos de contração do músculo liso vascular, nomeadamente no influxo de cálcio nas CMLV[107-109]. Para além disso, podem estimular recetores ativados por proteases (PAR), que são expressos nas CMLV, nas células endoteliais e nas plaquetas. Estes recetores intervêm no aumento da produção local de fatores relaxantes do tónus vascular como o óxido nítrico, a prostaciclina e o fator hiperpolarizador derivado do endotélio[110, 111]. As MMP podem também intervir de formas diferentes no relaxamento e na vasodilatação da parede venosa, nomeadamente na estimulação de recetores acoplados às proteínas-G[23], que também podem despoletar aumentos de produção de óxido nítrico, e no caso da MMP2, no aumento direto de fator hiperpolarizador derivado do endotélio, o qual altera as trocas iónicas transmembranares e origina a hiperpolarização e relaxamento tecidual[107].

Inibidores de metaloproteinases e rácio MMP/TIMP

Foi demonstrado que a expressão de TIMP2 e TIMP3 está aumentada em segmentos de veia hipertrofiada, quando comparados com segmentos atroficos, e que isso poderia ser devido à diminuição da atividade de MMP, à redução do *turnover* da MEC e à deposição de fibras conjuntivas[112]. Apesar disso, como se explicará posteriormente (cf. secção 4.1), é possível que a diminuição da expressão e atividade de MMP não se traduza necessariamente na diminuição do *turnover* da MEC, caso o rácio MMP/TIMP se apresente positivo. Este fenómeno dificulta o estudo destas moléculas e acrescenta complexidade na obtenção de resultados fidedignos, por exemplo através do acréscimo de variáveis tais como a região anatómica ou o estágio clínico da doença, como se fez na presente investigação.

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador- β 1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

1.3.3 O fator transformador de crescimento β -1

O TGF- β 1 é um peptídeo altamente complexo com propriedades multifuncionais, que tem um papel ativo no desenvolvimento embrionário, em vários processos fisiológicos (p.e. angiogénese e regulação da função celular, incluindo a proliferação, diferenciação, migração e apoptose), assim como na fisiopatologia de diversas doenças, incluindo neoplasias, doenças autoimunes, doenças com processos fibróticos relevantes e patologias cardiovasculares. É também muito provável que intervenha no processo fisiopatológico da DVeC, nomeadamente no processo de enfraquecimento da parede venosa, através da influência direta ou indireta na expressão e atividade de MMP e TIMP, utilizando para esse fim diferentes vias de sinalização.

As considerações teóricas relativas ao TGF- β 1 e a sua influência na DVeC podem ser encontradas integralmente no artigo de revisão publicado (cf. ponto 4.3).

1.4 Tratamento da doença venosa crónica

O método de tratamento da DVeC depende do estágio clínico da doença, da preferência do médico e/ou doente e de eventuais restrições económicas dos serviços de saúde de cada país.

Assim sendo, podem ser utilizados de forma isolada ou complementar métodos compressivos, terapias farmacológicas, ablação química, térmica ou cirúrgica.

A terapia compressiva continua a ser o tratamento conservador mais utilizado, por diversos fatores: é fácil de utilizar, apresenta características não invasivas e tem uma eficácia elevada para controlar a hipertensão venosa[21, 113]. Pode incluir o uso de meias elásticas, de ligaduras elásticas ou não elásticas ou o uso de compressão pneumática intermitente. Foi já demonstrado que, no caso dos estádios CEAP 1-4 da doença, o uso de meias elásticas de compressão progressiva graduada é mais eficiente do que o uso de meias elásticas sem este efeito[114]. No caso dos estádios CEAP 5-6 da doença, a compressão com ligaduras mostrou uma melhoria na taxa de cicatrização de úlceras, podendo mesmo ser utilizado o sistema da *bota d'Unna* (compressão com ligaduras impregnadas com uma pasta de óxido de zinco e, por vezes, calamina e glicerina). A compressão pneumática intermitente pode ser adicionada à terapia com ligaduras elásticas, tendo também ficado demonstradas uma melhoria do fluxo sanguíneo e das taxas de cicatrização de úlceras com este método[115].

O tratamento farmacológico inclui vários tipos de fármacos venoativos, que têm como função diminuir a permeabilidade capilar e a libertação de mediadores inflamatórios, bem como melhorar o tónus venoso[21]. No entanto, é importante admitir que existe alguma falta de evidência científica que suporte o uso da generalidade dos fármacos venoativos disponíveis no mercado. Ainda assim, foi demonstrada a eficácia dos flavonoides micronizados purificados na

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crônica dos membros inferiores

redução de sintomas como o edema, câimbras e a síndrome das pernas inquietas, assim como na cicatrização de úlceras venosas[21, 116, 117]. Da mesma forma, a pentoxifilina mostrou igualmente ter um papel eficaz na cicatrização de úlceras venosas[118].

A ablação química de varicosidades (escleroterapia) trata-se da injeção de um agente químico esclerosante (líquido ou em espuma) em veias dilatadas, que provoca a lesão do endotélio, a aderência da parede venosa, ou trombose local e consequente colapso do vaso[21]. Este procedimento não dispensa a associação da compressão externa pós-injeção, com uma ligadura ou uma meia elástica. Este método pode ser utilizado para tratar o espectro completo de varicosidades superficiais. Note-se, contudo, que a taxa de recorrência de veias varicosas é de cerca de 90% aos seis anos[21]. A injeção do agente esclerosante pode ser realizada com o auxílio de ecografia e ser complementar do tratamento por ablação térmica endovenosa ou cirúrgica, com o objetivo de melhorar os resultados terapêuticos[21].

Quanto ao tratamento por ablação térmica, existe a opção do uso do laser transcutâneo, que só demonstra alguns resultados aceitáveis para o caso das telangiectasias. A luz laser é aplicada através da pele e é seletivamente absorvida pela oxi-hemoglobina do sangue e convertida em energia térmica, originando a coagulação e "ablação" dos vasos[21]. No tratamento por ablação térmica são ainda incluídos os tratamentos endovenosos com laser, radiofrequência ou vapor, que se têm mostrado bastante populares no tratamento dos troncos venosos superficiais, devido às suas características minimamente invasivas, podendo ser utilizados por outros profissionais de saúde que não cirurgiões. Estes são procedimentos ecoguiados e incluem uma injeção com anestesia tumescente perivenosa e a introdução de um cateter na veia doente (em geral a VGS), que permite a transmissão de energia térmica e a ablação progressiva da mesma. A ablação por laser endovenoso apresenta taxas de oclusão venosa a um ano que rondam os 77-99%[119]. Quando comparado o uso do laser com as técnicas cirúrgicas mais invasivas, não existe, efetivamente, nalguns trabalhos uma diferença significativa na recorrência de varicosidades[21]. No entanto a cirurgia parece ser mais eficaz quando comparada com o uso da radiofrequência[21]. Surpreendentemente, as taxas de oclusão venosa entre as técnicas do laser e da radiofrequência parecem ser semelhantes, ainda que a radiofrequência pareça causar menos dor e hematomas[21, 120].

Existem também técnicas híbridas mecânicas e químicas, como o uso de cateteres endovenosos rotativos, que causam a abrasão endotelial e a simultânea injeção de um esclerosante químico.

Para finalizar, um dos tratamentos mais comuns é o tratamento cirúrgico clássico, que pode incluir a laqueação alta e/ou o *stripping* da VGS, a laqueação alta da veia pequena safena e a flebectomia. Demonstrou-se que o *stripping* da VGS diminui a taxa de recorrência de varicosidades em cerca de 20%, quando comparado com a laqueação alta exclusiva da mesma veia[121]. Ainda assim, não existe evidência científica de que estes procedimentos sejam

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

superiores à ablação térmica endovenosa[21]. Existem, porém, outras opções cirúrgicas que incluem métodos minimamente invasivos como por exemplo o CHIVA (*cure conservatrice et hémodynamique de l'insuffisance veineuse en ambulatoire*), cujo objetivo é eliminar os *shunts* veno-venosos, pela laqueação de pontos específicos de escape sanguíneo, preservando a VGS e a drenagem normal dos tecidos superficiais da perna, cujos resultados, nalguns trabalhos, se demonstraram superiores ao *stripping* da VGS e à terapêutica compressiva[122]. Outro método cirúrgico minimamente invasivo é a SEPS (*subfascial endoscopic perforator surgery*) que inclui a laqueação de veias perforantes insuficientes sob visão endoscópica e que demonstrou resultados bastante favoráveis[120].

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

2 Objetivos

Este trabalho de investigação tem por objetivo geral aprofundar o conhecimento da fisiopatologia da DVeC, através de dois objetivos mais específicos:

- 1) O estudo genético e imuno-histoquímico das MMP, dos TIMP e dos recetores de TGF- β (TGFBR) ao longo da evolução da doença.
- 2) A demonstração da ação direta do TGF- β 1 na expressão de MMP, TIMP e TGFBR na parede de VGS.

Na sequência dos objetivos apresentados, enunciaram-se as seguintes hipóteses de investigação para este trabalho:

Hipótese 1 - Existem diferenças estatisticamente significativas na expressão génica de MMP, TIMP e TGFBR entre VGS saudáveis e VGS insuficientes, colhidas na região talocrural.

Hipótese 2 - Existem diferenças estatisticamente significativas na expressão génica de MMP, TIMP e de TGFBR entre veias com DVeC em estágio inicial (CEAP2-3) e veias com DVeC em estágio avançado (CEAP4-6), de três regiões diferentes de veia (região talocrural e safenofemoral da VGS e região tributária à VGS).

Hipótese 3 - Existem diferenças na imunomarcção de MMP2, TIMP2 e de TGFBR2 entre VGS saudáveis e VGS insuficientes, colhidas na região talocrural.

Hipótese 4 - Existem diferenças na imunomarcção de MMP2, TIMP2 e de TGFBR2 entre veias com DVeC em estágio inicial (CEAP2-3) e veias com DVeC em estágio avançado (CEAP4-6), de três regiões diferentes de veia (região talocrural e safenofemoral da VGS e região tributária à VGS).

Hipótese 5 - Existem diferenças estatisticamente significativas na expressão génica de MMP, TIMP e de TGFBR entre VGS saudáveis tratadas com TGF- β 1 e VGS saudáveis não tratadas com TGF- β 1.

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

3 Metodologia

Seguidamente descrever-se-á a metodologia utilizada neste trabalho de investigação, incluindo os diferentes métodos laboratoriais usados. Esta também é genericamente descrita adiante, no capítulo dos resultados, incluída nos artigos publicados.

3.1 Desenho da investigação

Para testar as hipóteses anteriormente descritas recorreu-se a um estudo observacional, no qual se observou a ocorrência de determinado fenómeno, e outro experimental, no qual houve manipulação de determinadas variáveis. Ambos os estudos foram transversais (as observações foram feitas num determinado momento), e de caso-controlo, ou seja, houve recurso a um grupo de comparação. No primeiro estudo, o grupo experimental foi constituído por veias insuficientes e o grupo controlo por veias saudáveis. No segundo estudo, o grupo experimental foi constituído por veias saudáveis tratadas com TGF- β 1 e o grupo controlo por veias saudáveis não tratadas com TGF- β 1.

Os critérios de seleção das amostras foram previamente definidos e na seleção das amostras não foi utilizado qualquer método probabilístico (amostragem por conveniência). Por serem estudos exploratórios, não se recorreu ao cálculo prévio do tamanho da amostra.

3.2 Recolha, preparação e análise das amostras

Os estudos decorreram no Centro de Investigação de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior (CICS-UBI), localizado na Faculdade de Ciências da Saúde desta universidade, na Covilhã. A recolha das amostras foi realizada no período intraoperatório em intervenções cirúrgicas realizadas no Centro Hospitalar da Cova da Beira (CHCB) e no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC).

As amostras foram recolhidas em indivíduos com características clínicas diferentes. As amostras de veia insuficiente foram obtidas de um grupo de doentes diagnosticado com DVeC dos membros inferiores e sujeitos a tratamento cirúrgico no CHCB, enquanto as amostras de veia saudável foram obtidas de um grupo de doentes com patologia coronária, submetidos a cirurgia de *bypass* coronário no CHUC, mas sem evidência de DVeC dos membros inferiores.

Em cada indivíduo do primeiro grupo de doentes foi realizado um estudo imagiológico dos seus membros inferiores (previamente ao tratamento cirúrgico) com recurso a *ecodoppler* venoso (com o objetivo de documentar a existência de insuficiência venosa), e cada um dos

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

doentes respondeu a um questionário de escolha múltipla e resposta breve (cf. anexo I), relacionado com os seus dados demográficos e clínicos. Foram recolhidas amostras da VGS em três locais distintos: 2 a 3 cm de veia próxima à junção safenofemoral (amostra safenofemoral), 2 a 3 cm de veia colhida junto ao maléolo interno (amostra talocrural) e 2 a 3 cm de veia tributária da VGS (amostra tributária).

Da mesma forma, em cada indivíduo do segundo grupo de doentes (controlo) foi realizado um estudo imagiológico prévio dos membros inferiores, com recurso ao *ecodoppler* venoso (com o objetivo de documentar a inexistência de insuficiência venosa). A recolha dos dados demográficos e clínicos foi também realizada através de um questionário de escolha múltipla e resposta breve (cf. anexo I). Foram recolhidas amostras de 2 a 3 cm de VGS da região talocrural.

Com o propósito de controlar os efeitos de fatores extrínsecos à DVeC, foram excluídos do estudo os indivíduos que apresentavam os seguintes critérios: (I) doentes sujeitos a intervenção cirúrgica no período prévio de seis semanas, (II) medicados com corticosteroides, (III) com história de uso de drogas intravenosas, (IV) com história de trombose venosa profunda ou tromboflebite superficial, (V) com infeção ativa, (VI) ou com comorbilidades como a diabetes mellitus, neoplasia, artrite reumatóide, vasculite ou doenças do colagénio.

Todas as amostras de veia (insuficientes e saudáveis) utilizadas para estudo genético foram tratadas de acordo com o seguinte método: lavagem com soro fisiológico (evitando a contaminação com sangue), imersão em RNA-Later (Ambion®), refrigeração a 4°C por 24h e armazenamento em nitrogénio líquido, a -80°C, até utilização posterior. As amostras de veia para estudo imuno-histoquímico foram lavadas e armazenadas de modo semelhante, sendo depois imersas em formol durante 24h, de seguida transferidas para uma solução de álcool a 70% e posteriormente imersas em blocos de parafina. Finalmente, as amostras de veia para cultura de tecido foram lavadas, imersas em 8mL de meio de cultura RPMI 1640 (GIBCO®) e transferidas, assim que possível, para uma placa de *Petri* com o meio de cultura *William's* (GIBCO®) (ver adiante).

Depois da extração de ácido ribonucleico (RNA) e da síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) correspondente das amostras de tecido venoso (cf. secção 3.2.1), foi realizada a *real time-polymerase chain reaction* convencional (RT-PCR) (cf. secção 3.2.2) num *pool* contendo cDNA de todas as amostras de veias insuficientes e saudáveis. Este procedimento foi realizado com o objetivo de confirmar a existência de expressão das diferentes MMP, TIMP e TGFBR em estudo. Quando a existência de qualquer uma das moléculas não foi demonstrada, o procedimento foi repetido e o resultado confirmado com a RT-PCR de um controlo positivo. Foi depois realizada a *quantitative real time-polymerase chain reaction* (qPCR) (cf. secção 3.2.3) em cada uma das diferentes amostras de veia colhidas, com o propósito de quantificar a expressão das MMP, TIMP e TGFBR cuja expressão

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador- β 1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

foi demonstrada previamente por RT-PCR no *pool* de cDNA. Posteriormente foi realizado o estudo imuno-histoquímico das amostras de veia com o objetivo de detetar a MMP2, o TIMP2 e o TGF β 2 na parede venosa. A seleção destas moléculas foi baseada nos resultados prévios das qPCRs, assumindo-se que as moléculas que apresentaram expressões mais elevadas, teriam maior probabilidade de demonstrar diferenças na imunomarcação.

Finalmente, com a intenção de demonstrar um efeito direto do TGF- β 1 na expressão de MMP, TIMP e TGF β R, foi realizada a cultura de tecido venoso saudável. Cada segmento de veia colhido foi dividido em duas porções idênticas que incluíram um grupo de amostras tratado com TGF- β 1, e um outro grupo de amostras que não foi tratado, realizando-se posteriormente a qPCR de cada amostra, para avaliar as diferenças de expressão das moléculas em estudo.

3.2.1 Extração de ácido ribonucleico e síntese de ácido desoxirribonucleico complementar

O RNA total foi isolado de 50-100mg de amostra de veia, utilizando o reagente TRI (Ambion®), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram homogeneizadas, centrifugadas e lavadas com etanol a 75%. A quantidade do RNA extraído foi avaliada por espectrofotometria a 260nm e 280nm (Pharmacia Biotech, Ultraspec-3000) e a sua qualidade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1%, visualizando o RNA com GreenSafe (NZYTech®, Lisboa, Portugal) à luz ultravioleta.

Para a síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA), foram inversamente transcritos 500ng de RNA total usando o *Kit M-MuLV Reverse Transcriptase* (NZYTech®, Lisboa, Portugal) num volume final de 20 μ L. A reação de síntese de cDNA foi realizada num termociclador Bio-Rad (Hercules, CA, EUA) e foi iniciada por uma incubação a 25°C durante 10min, seguida de um ciclo de 60min a 37°C e uma fase de inativação a 70°C durante 15min. O cDNA sintetizado foi armazenado a -20°C até uso posterior.

3.2.2 Real time-polymerase chain reaction convencional (RT-PCR)

Este método foi realizado usando o kit NZYTaQ DNA polimerase (NZYTech®, Lisboa, Portugal) de acordo com as instruções do fabricante. As RT-PCRs foram realizadas num volume final de 25 μ L, dos quais 1 μ L de cDNA previamente sintetizado, 0,1 μ L de Taq DNA polimerase (5U/ μ L), 0,625 μ L de solução de desoxirribonucleotídeo trifosfato (10mM), 1,2 μ L de *primers sense* e *antisense* (5pmol/ μ L) para cada gene estudado (cf. tabela 2), 1,5 μ L de MgCl₂ (50mM), 16,875 μ L de água esterilizada e 2,5 μ L de 10x tampão de Taq DNA polimerase. Antes da amplificação, a integridade do cDNA foi testada pela amplificação do gene *housekeeping* β -actina. As amostras foram então amplificadas usando um termociclador Bio-Rad (Hercules, CA, EUA) programado para: 5min de desnaturação a 95°C, 35 ciclos (30 ciclos para a β -actina) de 30s a 95°C, seguido de *annealing* de 30s a 60°C e extensão de 30s a 72°C. O ciclo final foi seguido por um período de 5min a 72°C de modo a assegurar a dupla cadeia do DNA

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

amplificado. Os produtos das RT-PCRs foram depois sujeitos a eletroforese em gel de agarose a 1% e visualizados com GreenSafe (NZYTech®, Lisboa, Portugal) à luz ultravioleta.

Tabela 2 - *Primers* usados nas experiências de RT-PCR.

<i>Primers</i>	Sequência (5'-3')	Tamanho dos amplicões (pb)
B-actina	<i>Sense</i> : CAT CCT CAC CCT GAA GTA CCC	202
	<i>Antisense</i> : AGC CTG GAT AGC AAC GTA CAT G	
TIMP1	<i>Sense</i> : GAC GGC CTT CTG CAA TTC C	79
	<i>Antisense</i> : GTA TAA GGT GGT CTG GTT GAC TTC TG	
TIMP2	<i>Sense</i> : GAG CCT GAA CCA CAG GTA CCA	77
	<i>Antisense</i> : AGG AGA TGT AGC ACG GGA TCA	
TIMP3	<i>Sense</i> : CCA GGA CGC CTT CTG CAA	73
	<i>Antisense</i> : CCC CTC CTT TAC CAG CTT CTT C	
TIMP4	<i>Sense</i> : CAG CCT CAG CAG CAC ATC TG	75
	<i>Antisense</i> : GGC CGG AAC TAC CTT CTC ACT	
MMP2	<i>Sense</i> : AAC TAC GAT GAC GAC CGC AAG T	142
	<i>Antisense</i> : AGG TGT AAA TGG GTG CCA TCA	
MMP9	<i>Sense</i> : AGG CGC TCA TGT ACC CTA TGT AC	111
	<i>Antisense</i> : GCC GTG GCT CAG GTT CA	
MMP12	<i>Sense</i> : CGC CTC TCT GCT GAT GAC ATA C	136
	<i>Antisense</i> : GGT AGT GAC AGC ATC AAA ACT CAA A	
TGFB2	<i>Sense</i> : GCA GGT GGG AAC TGC AAG AT	76
	<i>Antisense</i> : GAA GGA CTC AAC ATT CTC CAA ATT C	
TGFB3	<i>Sense</i> : CTG TTC ACC CGA CCT GAA AT	502
	<i>Antisense</i> : CGT CAG GAG GCA CAC ACT TA	

pb - pares de bases

3.2.3 Quantitative real time-polymerase chain reaction (qPCR)

Este método foi realizado com o kit SYBR-Green/Fluorescein qPCR-Master-Mix (Fermentas-Life-Sciences®, Vilnius, Lituânia) e com os *primers* específicos para cada gene (cf. tabela 2).

As reações realizaram-se num volume final de 20µL, dos quais 1µL de cDNA sintetizado, 10µL SYBR-Green/Fluorescein, 1,2µL de *primers sense* e *antisense* (5pmol/µL) para cada gene e 6,6µL de água esterilizada. A normalização da expressão de cada um dos genes foi realizada com o gene *housekeeping* β-actina (os genes β2-microglobulina e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase [GADPH] também foram testados, sendo que a escolha recaiu no gene da β-actina por se constatarem ligeiras diferenças na expressão dos outros dois genes, entre amostras de veias saudáveis e insuficientes). A concentração e a temperatura de *annealing* para cada conjunto de *primers* foram previamente otimizadas e a especificidade dos

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador- β 1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

amplificação foi determinada pela análise das curvas de dissociação. As amostras foram amplificadas com um sistema de deteção de *real-time PCR* IQ5 da Bio-Rad (Hercules, CA, EUA), programado para realizar 3min de desnaturação inicial a 95°C, seguido de 35 ciclos (30 ciclos para a β -actina) de 10s a 95°C, 30s de *annealing* a 60°C e 10s de extensão a 72°C. Os fragmentos amplificados de qPCR foram depois analisados através das suas curvas de dissociação, tendo sido submetidos ao aquecimento gradual entre 55 e 95°C, com períodos de espera de 10s entre cada valor da temperatura (0,05°C/s). As expressões génicas foram calculadas com base no modelo matemático proposto por Pfaffl[123] utilizando a fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.2.4 Imuno-histoquímica

As amostras foram previamente imersas em paraformaldeído a 2% / glutaraldeído a 0,2% durante 24h e depois foram transferidas para uma solução de álcool a 70% e imersas em parafina no dia seguinte. Os blocos de parafina com as amostras de veia foram depois cortados em secções de 6mm e montados em lâminas revestidas com poli-L-lisina. Foram utilizados os anticorpos Anti-MMP2, Anti-TIMP2 e o Anti-TGF β 2 (Abcam®; Cambridge, Reino Unido) após a realização de testes de controlo positivo para cada anticorpo, em diferentes amostras de tecido de acordo com a indicação do fabricante (cf. tabela 3).

Tabela 3 - Anticorpos primários usados nas experiências imuno-histoquímicas e respetivos controlos positivos, diluição e tempo de aplicação.

Anticorpo	Controlo Positivo	Diluição	Tempo de aplicação
Anti-MMP2	Carcinoma ductal invasivo da mama	1:700	60 Minutos
Anti-TIMP2	Adenocarcinoma do cólon	1:500	
Anti-TGF β 2	Córtex cerebral saudável	1:500	

As lâminas posteriormente montadas foram desparafinizadas, re-hidratadas, e tratadas com uma solução Trilogy (Cell Marque®, Rocklin, CA, EUA). A atividade endógena da peroxidase foi bloqueada pela incubação, durante 10min, em peróxido de hidrogénio a 3%. Antes e depois de cada incubação, as lâminas foram lavadas com TBS-T (Tris Buffered Saline + Tween 20) (Rockford, IL, EUA) à temperatura ambiente, durante 5min, por duas vezes. As lâminas foram depois incubadas à temperatura ambiente, durante 1h, com os anticorpos primários policlonais de coelho contra anti-MMP2 (diluição de 1:700; ab38917), TIMP2 (diluição de 1:500; ab74216) e TGF β 2 (diluição de 1:500; ab61213) humanos. Foi utilizado um anticorpo secundário anti-coelho biotilado IgG de cabra (Vector Laboratories®, Burlingame, CA, EUA). A especificidade da marcação foi avaliada pela omissão do anticorpo primário. Após a amplificação durante 10min e a deteção durante outros 10min, as lâminas foram incubadas numa solução de DAB (diaminobenzidina) numa câmara escura durante 10min. Posteriormente

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

foi realizado o contraste com hematoxilina de *Mayer* durante 3min, seguido de lavagem por um período de 10min.

As lâminas resultantes foram avaliadas de forma "cega", quanto à intensidade de marcação no laboratório de semiótica do CICS-UBI, realizado por dois investigadores e em três dias diferentes. Sendo classificada da seguinte forma: – negativo; + marcação discreta; ++ marcação moderada; +++ marcação intensa. A observação das lâminas foi realizada com um microscópio confocal de varredura a laser Zeiss LSM-710 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) com a ampliação de 400x e com a mesma luminosidade, fotografando-se as imagens obtidas.

3.2.5 Cultura de veia grande safena

As amostras de veia saudável com cerca de 2 a 3 cm de comprimento, colhidas cirurgicamente da região talocrural, foram refrigeradas a 4°C em tubos de 15mL, com 8mL de RPMI 1640 (GIBCO®) contendo: 20mmol/L de ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfónico, 10U/mL de penicilina, 10mg/mL de estreptomicina e 0,25mg/mL de anfotericina B. Foram transportadas, assim que possível, para o laboratório e lavadas de forma estéril com um meio de cultura idêntico (RPMI 1640). Cada amostra foi seccionada, originando dois segmentos de 5mm X 10mm, que foram abertos e colocados em duas placas de *Petri* esterilizadas diferentes (de 60mm X 20mm). A face luminal dos segmentos venosos foi colocada virada para cima, numa base de 6mm de Sylgard 184 (Dow Corning®) endurecida, com a ajuda de duas agulhas de 25-gauge esterilizadas. Foi realizado um pequeno canal na resina de Sylgard, de modo a permitir a nutrição adequada da face posterior do tecido, prevenindo a sua necrose. Foi adicionado o meio de cultura *William's* (GIBCO®) contendo: 2g/L de bicarbonato de sódio, 5U/mL de penicilina, 5µg/mL de estreptomicina, 2,5µg/mL de gentamicina, 12,5ng/mL de anfotericina B, 2mmol/L de L-glutamina e 30% FBS (soro bovino fetal). O tecido foi cultivado durante 10 dias a 37°C num ambiente estático de 5% CO₂, sendo o meio de cultura substituído de forma asséptica a cada dois dias. Após seis dias, a uma das placas de *Petri* foi adicionado TGF-β1 numa concentração de 10ng/mL, nada sendo adicionado à outra placa. Dois dias depois, ao substituir o meio de cultura, repetiu-se o procedimento de igual forma com o TGF-β1. As duas placas foram mantidas nas mesmas condições durante mais dois dias, sendo as amostras seguidamente armazenadas em nitrogénio líquido (-80°C) até utilização posterior. As amostras foram mais tarde submetidas a análise da expressão de MMP, TIMP e TGFβR por qPCR (cf. secção 3.2.3).

3.3 Características demográficas e clínicas dos participantes

Neste estudo participaram 13 indivíduos com VGS saudável e 31 indivíduos com VGS insuficiente (destes 19 apresentavam DVeC em estágio inicial e 12 em estágio avançado). As características sociodemográficas e clínicas são apresentadas na tabela 4.

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

Tabela 4 - As características sociodemográficas e clínicas dos participantes nos estudos.

Características		Indivíduos com VGS saudável (n (%))	Indivíduos com VGS insuficiente (n (%))	
Género	Feminino	3 (23,1%)	23 (74,2%)	
	Masculino	10 (76,9%)	8 (25,8%)	
Idade (a)		67,85 ± 2,679 (54-81)	57,61 ± 1,56 (40-77)	
Índice de massa corporal (IMC) (kg/m ²)		25,28 ± 0,935 (20,89-29,07)	28,49 ± 0,80 (22,83-37,46)	
CEAP	C0	13 (100%)	0 (0,0%)	
	C2	0 (0,0%)	2 (6,5%)	
	C3	0 (0,0%)	17 (54,8%)	
	C4	0 (0,0%)	10 (32,2%)	
	C5	0 (0,0%)	1 (3,25%)	
	C6	0 (0,0%)	1 (3,25%)	
Fatores de risco	Idade (a)	≤55	2 (15,4%)	12 (38,7%)
		≥56	11 (84,6%)	19 (61,3%)
	IMC (kg/m ²)	Peso normal (IMC=18,5-25)	7 (53,8%)	9 (29%)
		Excesso de peso (IMC=25,1-30)	6 (46,2%)	10 (32,3%)
		Obesidade (IMC≥30)	0 (0,0%)	11 (35,5%)
	Gravidez (nº)		2,33 ± 1,856 (0-6)	2,39 ± 0,25 (0-5)
	Hipertensão arterial		12 (92,3%)	13 (41,9%)
	Doença hemorroidária		0 (0,0%)	12 (38,7%)
	Veias varicosas durante a gravidez		0 (0,0%)	16 (69,6% das mulheres)
	História familiar de DVeC		0 (0,0%)	23 (74,2%)
	Hábitos tabágicos		8 (61,5%)	7 (22,6%)
	Doença articular dos membros inferiores		0 (0,0%)	9 (29%)

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

Tabela 4 - As características sociodemográficas e clínicas dos participantes nos estudos (continuação).

Características		Indivíduos com VGS saudável (n (%))	Indivíduos com VGS insuficiente (n (%))
Sintomas de DVeC	Pernas pesadas	0 (0,0%)	24 (77,4%)
	Síndrome das pernas inquietas	0 (0,0%)	12 (38,7%)
	Dor nas pernas	0 (0,0%)	24 (77,4%)
	Edemas das pernas	0 (0,0%)	23 (74,2%)
	Prurido nas pernas	0 (0,0%)	23 (74,2%)
	Cãimbras musculares nos membros inferiores	0 (0,0%)	19 (61,3%)
Tratamento conservador	Uso de fármacos venoativos	0 (0,0%)	15 (48,4%)
	Exercício físico regular	0 (0,0%)	8 (25,8%)
	Uso regular de meias de compressão	0 (0,0%)	11 (35,5%)

3.4 Análise estatística dos dados

A análise estatística foi realizada com o programa *IBM SPSS Statistics* (v.22.0, Armonk, NY, EUA). Foram utilizados subgrupos da amostra total de sujeitos para cada um dos estudos. Assim, para o estudo das diferenças na expressão génica das MMP, TIMP e TGFBR em veias saudáveis e insuficientes, foram utilizadas subamostras dos 44 indivíduos, selecionadas de modo a que os grupos não apresentassem diferenças estatisticamente significativas quanto às características clínicas e sociodemográficas (à parte da classificação CEAP). A equivalência dos grupos quanto a estas características foi avaliada pelo teste exato de *Fisher* ou pela sua extensão de *Freeman-Halton* (no caso de tabelas de contingência 2 X 3), assim como pelos testes *t* de *Student* e *ANOVA* (conforme o caso). Foram estudadas as diferenças entre as médias de três grupos (controlos vs. CEAP2-3 vs. CEAP4-6) e entre as médias de dois grupos (CEAP2-3 vs. CEAP4-6 e veias controlo vs. veias tratadas com TGF-B1), recorrendo aos testes *ANOVA* (seguido do teste de *Bonferroni*), e *t* de *Student* (seguido do teste para cálculo do tamanho do efeito de *d* de *Cohen*, no caso do estudo veias saudáveis vs. veias saudáveis tratadas com TGF-B1), respetivamente. Para cumprir os pressupostos exigidos pelos testes paramétricos, os dados foram transformados usando a fórmula $\log_{10}(x)$ e os valores extremos (*outliers*) controlados, sempre que necessário. Quando os pressupostos não foram cumpridos, utilizaram-se testes não-paramétricos (teste de *Kruskal-Wallis*, seguido do teste de *Mann-Whitney*).

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

Os dados descritivos são apresentados fazendo uso das frequências absolutas e relativas e valores médios \pm o erro padrão da média. Todos os testes foram bicaudais e foi estipulado um nível de significância estatística (α) de 0,05.

3.5 Considerações éticas e legais

Os procedimentos utilizados no presente trabalho de investigação respeitaram os princípios éticos e legais que guiam a investigação médica em seres humanos, consagrados em diversos documentos oficiais (p.e., Declaração de Helsínquia da Associação Médica Mundial¹, Manual para Comissões de Ética da Organização Mundial de Saúde², Diretiva 2001/20/CE do Parlamento Europeu e do Conselho da União Europeia³ e Resposta do Conselho Nuffield sobre Bioética ao Projeto de Lei de Tecido Humano⁴). Não havendo a pretensão de enumerar todas as boas práticas seguidas durante esta investigação, destacam-se apenas as seguintes:

I. A investigação foi apreciada e foi dado parecer favorável para a sua realização pela Comissão de Ética do CHCB (anexo II).

II. Todos os participantes receberam informação detalhada e precisa sobre o estudo em que iriam participar e facultaram o seu consentimento por escrito (anexo III e IV).

III. O anonimato dos participantes foi garantido através da atribuição de um código numérico aos seus dados, não constando assim dos formulários ou da base de dados informática qualquer elemento identificativo.

IV. As amostras de veias usadas foram obtidas durante os procedimentos cirúrgicos a que os utentes foram sujeitos para efeitos de tratamento, sem acarretarem riscos ou benefícios acrescidos, e foram utilizadas na sua totalidade durante o estudo, não sendo necessária, por isso, a sua inceneração.

¹ Consultar em http://ordemosmedicos.pt/wp-content/uploads/2017/09/Helsinq_traducao_para_portugues.pdf.

² Consultar em http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44783/1/9789241502948_eng.pdf.

³ Consultar em http://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-1/dir_2001_20/dir_2001_20_pt.pdf.

⁴ Consultar em <http://nuffieldbioethics.org/wp-content/uploads/NCOB-response-HT-bill.pdf>.

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador- β 1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

4 Artigos publicados

Os principais resultados desta investigação encontram-se publicados, sendo possível encontrar a reprodução textual dessas publicações nesta secção da tese.

4.1 Artigo I: *Variability of MMP/TIMP and TGF- β 1 Receptors throughout the Clinical Progression of Chronic Venous Disease*



Article

Variability of MMP/TIMP and TGF- β 1 Receptors throughout the Clinical Progression of Chronic Venous Disease

Pedro Serralheiro ^{1,2,*} , António Novais ², Elisa Cairrão ², Cláudio Maia ², Carlos M. Costa Almeida ^{3,4} and Ignacio Verde ²

¹ Norfolk and Norwich University Hospital, Norwich NR47UY, UK

² Faculty of Health Sciences, CICS-UBI—Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, 6201-506 Covilhã, Portugal; a25155@fcsaude.ubi.pt (A.N.); ecairrao@fcsaude.ubi.pt (E.C.); cmaia@fcsaude.ubi.pt (C.M.); iverde@fcsaude.ubi.pt (I.V.)

³ Department of General Surgery (C), Coimbra University Hospital Centre, 3041-801 Coimbra, Portugal; c.m.costa.almeida@gmail.com

⁴ Faculty of Medicine, University of Coimbra, 3000-548 Coimbra, Portugal

* Correspondence: pedro.serralheiro@nnuh.nhs.uk; Tel.: +44-1603-286-286; Fax: +44-1603-287-211

Received: 29 November 2017; Accepted: 19 December 2017; Published: 21 December 2017

Abstract: Chronic venous disease (CvD) is a prevalent condition with a significant socioeconomic burden, yet the pathophysiology is only just beginning to be understood. Previous studies concerning the dysregulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)) within the varicose vein wall are inconsistent and disregard clinical progression. Moreover, it is highly plausible that MMP and TIMP expression/activity is affected by transforming growth factor (TGF)- β 1 and its signaling receptors (TGF β Rs) expression/activity in the vein wall. A case–control study was undertaken to analyze genetic and immunohistochemical differences between healthy ($n = 13$) and CvD (early stages: $n = 19$; advanced stages: $n = 12$) great saphenous vein samples. Samples were grouped based on anatomic harvest site and subjected to quantitative polymerase chain reaction for *MMP1*, *MMP2*, *MMP8*, *MMP9*, *MMP12*, *MMP13*, *TIMP1*, *TIMP2*, *TIMP3*, *TIMP4*, *TGF β 1*, *TGF β 2*, and *TGF β 3* gene expression analysis, and then to immunohistochemistry for immunolocalization of MMP2, TIMP2, and TGF β 2. Decreased gene expression of *MMP12*, *TIMP2*, *TIMP3*, *TIMP4*, and *TGF β 2* was found in varicose veins when compared to controls. Regarding CvD clinical progression, two facts arose: results across anatomical regions were uneven; decreased gene expression of *MMP9* and *TGF β 3* and increased gene expression of *MMP2* and *TIMP3* were found in advanced clinical stages. Most immunohistochemistry results for tunica intima were coherent with qPCR results. In conclusion, decreased expression of TGF β Rs might suggest a reduction in TGF- β 1 participation in the MMP/TIMP imbalance throughout CvD progression. Further studies about molecular events in the varicose vein wall are required and should take into consideration the venous anatomical region and CvD clinical progression.

Keywords: chronic venous disease; matrix metalloproteinases (MMPs); tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs); transforming growth factor (TGF)- β receptors; varicose vein; gene expression

1. Introduction

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a large family of endopeptidases that are secreted in their latent form by different cells in the venous wall (including fibroblasts, vascular smooth muscle cells, and leukocytes) and have proteolytic activities that participate in cellular homeostasis, adaptation,

and tissue remodeling [1–3]. They are known for degrading collagen, elastin, and other extracellular matrix (ECM) macromolecules present in the structure of many tissues [1,2], and may affect other cellular processes including endothelium-mediated dilation, vascular smooth muscle cell migration and proliferation, as well as modulation of Ca^{2+} signaling and contraction in vascular smooth muscle [2,4]. MMP activity can be inhibited by four different tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP1–4) [1,2]. Tissue homeostasis is thus achieved by a tight balance of MMP and TIMP expression/activity. When this balance is disturbed, dysregulated MMP activities result—a fact associated with many diseases [3].

Transforming growth factor β (TGF- β) is a multifunctional growth factor that is widely expressed in diverse tissues, and which has critical and specific roles during embryogenesis and in maintaining the homeostasis of adult tissues [5]. This growth factor has three different isoforms in mammals (TGF β 1–3) [5,6]. TGF- β 1 is secreted in a latent complex by different cell types (including leukocytes, platelets, and osteocytes) and is a potent chemo-attractant for inflammatory cells [7–10]. TGF- β 1 signaling involves heteromeric complexes comprised of type I (e.g., transforming growth factor- β receptor 1 (TGF β R1)) and II (e.g., TGF β R2) transmembrane receptors, Smads (as signaling effectors, as well as transcription regulators), and non-Smad signaling pathways, leading to cell state-specific modulation of gene transcription [5,10]. TGF β R2 is capable of binding TGF- β 1 alone, while TGF β R1 can only bind the ligand in cooperation with TGF β R2 [5,10]. TGF- β 1 access to the signaling receptors is regulated by membrane-associated coreceptors (e.g., TGF β R3) that are thought to not signal directly [5,10].

Despite being intensively studied in the past decades, chronic venous disease (CvD) is far from being completely understood. Theoretical explanations regarding venous pathophysiology and genesis of varicosities in the lower limbs vary. Recent explanations suggest that venous hypertension may induce leukocyte-endothelial activation and initiation of a series of inflammatory processes with alterations at a molecular level within the vein wall (e.g., production of free radicals, inflammatory mediators, and proteolytic enzymes) leading to dilated and tortuous veins, valvular incompetence, and blood stasis, which in turn promote the perpetuation of local venous hypertension [7–16]. A variety of molecules, such as TGF- β 1, have been proposed to be involved in the regulation of leukocyte adhesion and recruitment [7,9–12,16,17]. Furthermore, a crucial role of MMP/TIMP imbalance in varicose vein formation and CvD progression has been increasingly recognized [9,10,12,17–28]. Nevertheless, published results are not always consistent and show wide discrepancy among them (i.e., the same proteins were found to be increased, decreased, and even unchanged in varicose vs. non-varicose veins) [29].

We have previously demonstrated that TGF- β 1 may directly intervene in the gene expression of MMP/TIMP in the great saphenous vein wall [30], which reinforced the hypothesis that the inflammatory process may lead to morphologic changes within the vein wall that is mediated by MMP and TIMP expression/activity [8,12,31]. Increasing knowledge about TGF- β 1 signaling mechanisms and regulation indicates that signaling responses are extensively defined by TGF- β 1 receptor availability and function [10,32]. It would, therefore, seem reasonable to expect that the effect of TGF- β 1 on MMP and TIMP expression/activity depends on TGF β R expression/activity within vein wall cells.

Although the MMP/TIMP derangement in varicose veins is widely accepted, little is known about what triggers this imbalance and how it is related to TGF- β 1 activity. Moreover, there are no studies associating MMP, TIMP, or TGF β R expression in vein wall cells with CvD clinical progression. With the aim of achieving a better understanding on how MMP/TIMP and TGF β R gene expression and their presence vary within healthy/varicose venous walls, a cross-sectional case–control study was undertaken to analyze genetic and immunohistochemical differences between CvD veins (grouped by clinical stages) and healthy veins.

2. Results

Table 1 summarizes the main demographic and clinical features of the participants. Ethnicity is not presented as all participants were Caucasian. In order to control demographic and clinical variability between groups, two subsamples of the 44 participants were used to study differences in gene expression among the control, CEAP2–3, and CEAP4–6 groups ($n = 29$) and between the CEAP2–3 and CEAP4–6 groups ($n = 31$). Therefore, differences regarding sex, age, BMI, and pregnancies presented $p > 0.05$.

Table 1. Participants’ demographic and clinical features. Data shown in this table refer to the total number of participants from which subgroups were selected (in order to achieve demographic and clinical feature equivalence) for further analyses.

Features		Control	CEAP2–3	CEAP4–6
Sex	Females	3 (23.08%)	14 (73.68%)	9 (75%)
	Males	10 (76.92%)	5 (26.32%)	3 (25%)
Age (a)		67.85 \pm 2.679 (54–81)	56.37 \pm 1.764 (40–74)	59.58 \pm 2.930 (45–77)
BMI (kg/m ²)		25.28 \pm 0.935 (20.89–29.07)	28.26 \pm 1.072 (22.83–37.46)	28.82 \pm 1.232 (23.15–35.55)
Pregnancies (No.)		2.33 \pm 1.856 (0–6)	2.07 \pm 0.322 (0–4)	2.89 \pm 0.351 (2–5)
CEAP	2	-	2 (6.45%)	-
	3	-	17 (54.84%)	-
	4	-	-	10 (32.25%)
	5	-	-	1 (3.23%)
	6	-	-	1 (3.23%)

2.1. MMP, TIMP, and TGF β R Gene Expression in Healthy and Varicose Vein Walls

PCR analysis confirmed the gene expression of all MMPs, TIMPs, and TGF β Rs in the vein samples, except for *MMP8* and *MMP13* (Figure 1). The absence of *MMP8* and *MMP13* gene expression was reconfirmed after using umbilical arteries and the PC3 prostate cell line cDNA as positive controls. Also, *MMP1* and *TGF β R1* were excluded from further qPCR analyses due to very low gene expression in the cDNA pools.

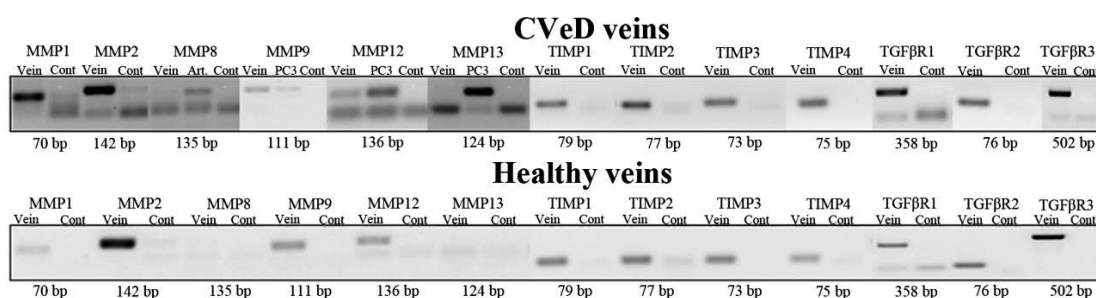


Figure 1. PCR analysis of several matrix metalloproteinases (MMPs), tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), and transforming growth factor- β receptors (TGF β Rs) in cDNA pools of varicose and healthy veins. Amplification of β -actin housekeeping gene was used as a control of the cDNA synthesis. Umbilical arteries or the PC3 prostate cell line was used as a positive control for the amplification of *MMP8*, *MMP9*, *MMP12*, and *MMP13* in varicose veins.

Figure 2 presents the comparison between healthy and CVeD veins from the tibiotarsal region. The gene expression of *MMP12* ($p = 0.006$), *TIMP2* ($p = 0.010$), *TIMP3* ($p = 0.026$), *TIMP4* ($p < 0.001$), and *TGF β R2* ($p = 0.001$) was significantly decreased in the CEAP2–3 veins when compared to controls.

Similarly, the gene expression of *TIMP4* ($p < 0.001$) and *TGF β 2* ($p = 0.019$) was significantly decreased in the CEAP4–6 veins when compared to controls.

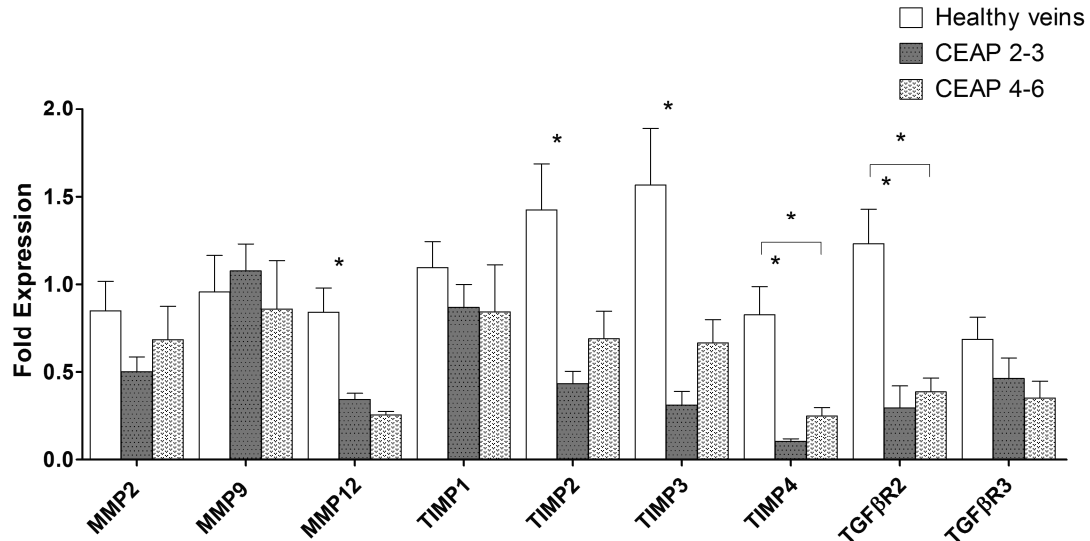


Figure 2. MMP, TIMP, and TGF β R gene expression in healthy, CEAP2–3, and CEAP4–6 veins (from the tibiotarsal junction). Their gene expression was determined by qPCR and after normalization with β -actin housekeeping gene. All results are expressed as fold expression. Error bars indicate mean \pm standard error of the mean (SEM), $n_{(\text{healthy})} = 13$, $n_{(\text{CEAP2-3})} = 10$, and $n_{(\text{CEAP4-6})} = 6$. * $p \leq 0.05$.

Comparisons between the CEAP2–3 and CEAP4–6 vein groups (Figure 3) from different anatomic harvest sites (tibiotarsal, saphenofemoral, and tributaries) were also performed. No significant differences in MMP, TIMP, and TGF β R gene expression were found between the two CEVd groups from the tibiotarsal junction. From the saphenofemoral junction, only *MMP9* gene expression was significantly lower in the CEAP4–6 veins ($p = 0.027$). Finally, in varicose tributary veins, *MMP2* ($p = 0.002$) and *TIMP3* ($p = 0.050$) gene expressions were significantly increased, while *TGF β R3* gene expression ($p = 0.002$) was significantly decreased in the CEAP4–6 group.

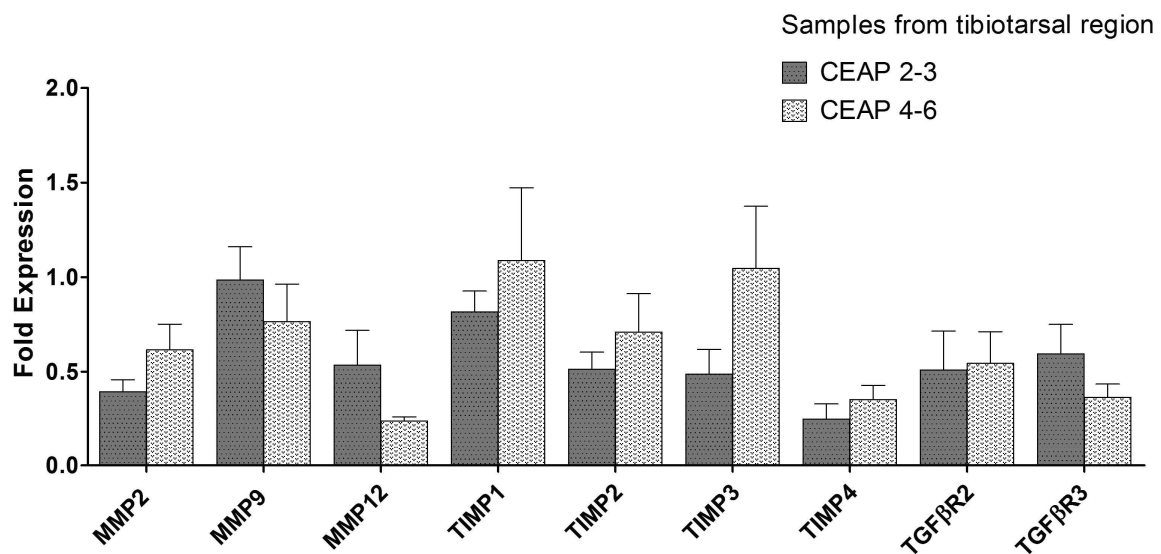


Figure 3. Cont.

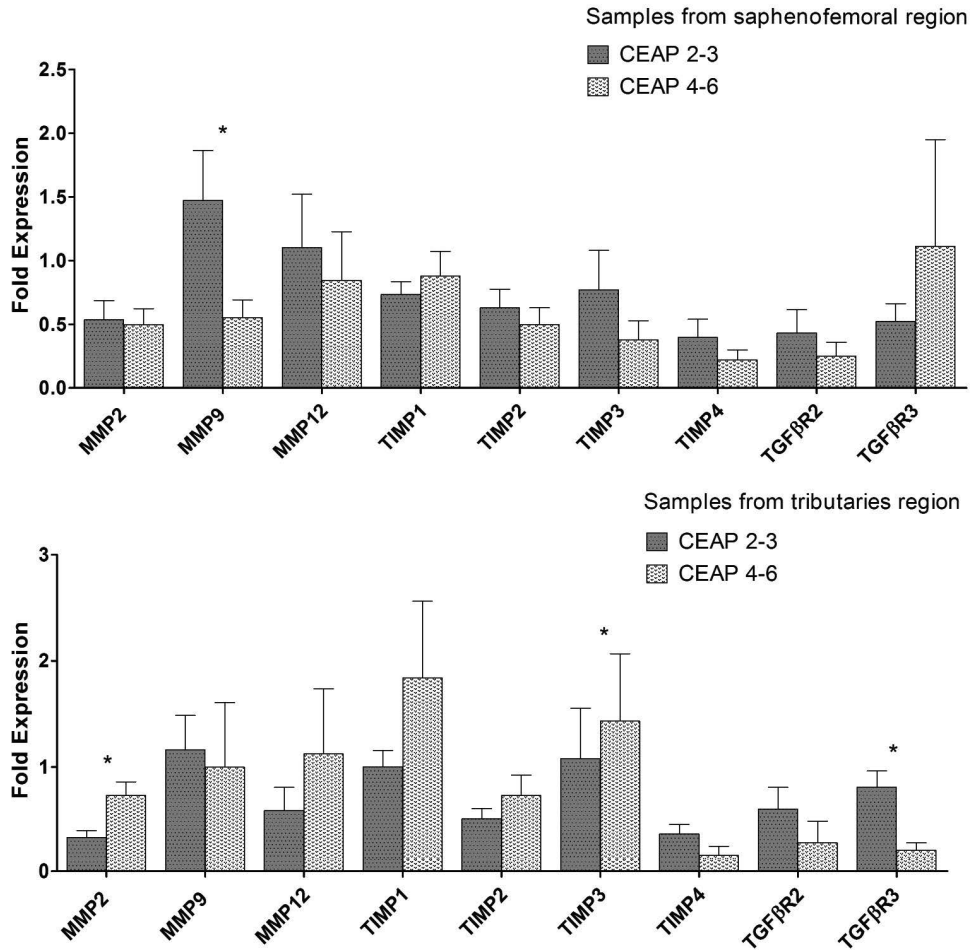


Figure 3. MMP, TIMP, and TGF β R gene expression in the CEAP2–3 and CEAP4–6 veins (from three different regions). Their gene expression was determined by qPCR after normalization with β -actin housekeeping gene. All results are expressed as fold expression. Error bars indicate mean \pm SEM, $n_{(CEAP2-3)} = 19$ and $n_{(CEAP4-6)} = 12$. * $p \leq 0.05$.

2.2. MMP, TIMP, and TGF β R Immunoreactivity in Healthy and Varicose Vein Walls

Qualitative results of IHC analysis are shown in Figure 4 and Table 2. Positive immunostaining for MMP2, TIMP2, and TGF β R2 was more consistently found in both intima and media layers of varicose and healthy veins. A closer look at the staining intensity revealed that MMP2 was decreased in all tunicae, TIMP2 was decreased in the intima and media, and TGF β R2 was slightly decreased in all tunicae of varicose veins when compared to controls.

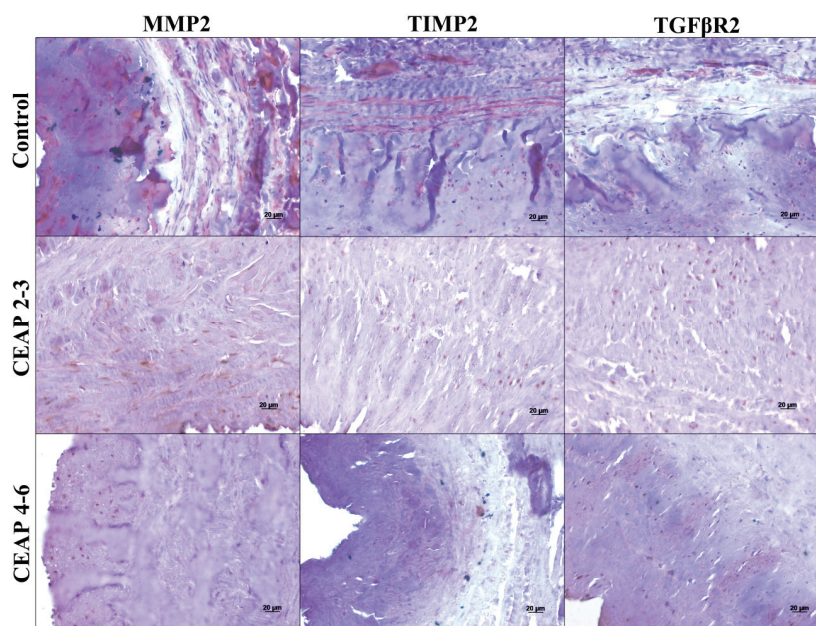


Figure 4. Immunodetection of MMP2, TIMP2, and TGF β 2 in healthy, CEAP2–3, and CEAP4–6 veins. Immunohistochemistry (IHC) was performed and revealed using a peroxidase substrate. Decreased labeling of proteins was observed in chronic venous disease veins. Scale bar represents 20 μ m.

Table 2. Immunodetection of MMP2, TIMP2, and TGF β 2 in tissue sections of healthy, CEAP2–3, and CEAP4–6 veins (from three different regions). The scores were established in a blinded manner by two independent observers, according to the labeling observed with a microscope, as follows: –, negative; +, discrete; ++, moderate and +++, intense.

Region	Tunica	Group	MMP2	TIMP2	TGF β 2
Tibiotalar junction	Intima	Controls	+++	++	+
		CEAP2–3	+	–	–/+
		CEAP4–6	+	+	+
	Media	Controls	+++	++	+
		CEAP2–3	+	+	–/+
		CEAP4–6	+	+	–
	Adventitia	Controls	+++	–	–/+
		CEAP2–3	–	–/+	–
		CEAP4–6	–	–	–
Saphenofemoral junction	Intima	CEAP2–3	++	+ / ++	+
		CEAP4–6	+	+	+
	Media	CEAP2–3	++	+ / ++	–/+
		CEAP4–6	–/+	+	–/+
	Adventitia	CEAP2–3	–	++	–
		CEAP4–6	–	–/+	–
Tributary	Intima	CEAP2–3	+	–	–/+
		CEAP4–6	+	–/+	–
	Media	CEAP2–3	+	+	–/+
		CEAP4–6	–	–/+	–/+
	Adventitia	CEAP2–3	–	–/+	–
		CEAP4–6	–	–	–

From the comparisons between the CVeD groups, MMP2 was generally unchanged (except for the saphenofemoral junction samples where it was decreased in the intima and media of the CEAP4–6 group), TIMP2 was generally decreased in the media and adventitia but slightly increased in the intima (except for the saphenofemoral samples) of the CEAP4–6 group, and TGF β R2 appeared to have no relevant difference among the groups.

3. Discussion

This cross-sectional case–control study was set up in an attempt to resolve existing discrepancies and gaps in the literature regarding the role of MMP/TIMP dysregulation in CVeD pathophysiology. Specifically, the aim was to take into consideration two other variables: TGF β R expression within the vein wall and CVeD clinical progression. Moreover, unlike the majority of the studies in this field, two methodological measures were taken for the purpose of controlling additional sources of variability. Firstly, specimens were grouped and compared based on anatomic harvest site (evidence that vein source and location may be a factor in the variability has been shown previously [19]), and secondly, comparison groups were matched regarding important demographic and clinical features.

The choice of specific MMPs was based on previously published studies [29], yet only genetic data concerning MMP2, MMP9, MMP12, TIMP1, TIMP2, TIMP3, TIMP4, TGF β R2, and TGF β R3 are discussed as RT-PCR results showed no detection of MMP8 and MMP13 gene expression. Likewise, qPCR results obtained from cDNA pools of CVeD and healthy veins showed negligible MMP1 and TGF β R1 gene expression. The absence of MMP8 and MMP13 gene expression in vein samples contradicts previous findings [19,28,33]. MMP8 is frequently associated with venous ulcer healing [34,35]; however, it may not intervene in venous wall restructuring.

In our study, gene expression of MMP12, TIMP2, TIMP3, TIMP4, and TGF β R2 was decreased in CVeD veins (especially in early clinical stages) when compared to healthy veins. Elevated gene expressions of MMP2, TIMP1, and TIMP3 in varicose veins were previously described [23,25], while decreased expression of MMP2 was also reported [18,24]. Methodological differences—for example, sample size, anatomic harvest site or use/non-use of effective control samples—may partially explain the conflicting results. The disparity in genetic data among studies may also be due to the broad range of morphologic presentations of varicose vein walls (atrophic or hypertrophic segments), and the possible existence of different phases in MMP and TIMP expression/activity throughout CVeD progression. It is plausible that the imbalance of these proteins favors atrophy during a primary phase and fibrosis during a secondary phase. In view of this, vein specimens at different CVeD stages were stratified for comparison in the current study.

Significant differences were only found between healthy and CVeD veins (i.e., these differences were not present between CVeD vein groups from the tibiotarsal junction—cf. Figures 2 and 3). Despite this, we believe that in a larger sample the trends presented in Figure 3 may achieve statistical significance. We also believe that these trends give a good representation of what happens in CVeD atrophic/hypertrophic phases: a local decrease in MMP and TIMP gene expression in varicose veins from the CEAP2–3 group (during the atrophic phase) followed by a local gradual increase in MMP and TIMP gene expression in varicose veins from the CEAP4–6 group (during the hypertrophic phase). Regarding TGF- β 1 receptors, decreased gene expression of the signal transducer TGF β R2 in varicose veins could suggest a counter-regulation mechanism to control chronically elevated local levels of TGF- β 1, leading to a reduction in participation of this growth factor in the MMP/TIMP imbalance throughout CVeD clinical progression. This is in line with previous studies advocating a correlation between TGF- β 1 enhanced expression/activity and the development of varicosities [10,12,36–38]. Although TGF- β 1-enhanced expression was previously found in varicose veins [36,37], its signal transducer receptor expression has not been extensively studied [39]. However, whilst our results for TGF β R gene expression may explain generally decreased gene expression of MMP and TIMP in CVeD veins (especially from early clinical stages) when compared to healthy veins, they do not explain the slightly increased gene expression of MMP and TIMP in the CEAP4–6 group (when compared to the

CEAP2–3 group). It might be that another inflammatory cytokine/growth factor (e.g., interleukins, vascular endothelial growth factor, or tumor necrosis factor- α) [40,41] may play a role in linking pressure-induced leukocyte infiltration, vein wall inflammation, and alteration in MMP and TIMP expression/activity during the CVeD hypertrophic phase.

Before discussing further results regarding CVeD clinical progression, it should be noted that genetic data across anatomical vein regions were uneven (Figure 3) and this may be important. If molecular events are not uniform in the venous system, measures of MMP and TIMP expression/activity should always be reported with reference to vein region and comparisons among vein specimens harvested from different anatomical regions might not be reliable.

Only gene expression of *MMP2*, *MMP9*, *TIMP3*, and *TGF β 3* presented differences between CVeD groups. On the one hand, *MMP2* and *TIMP3* gene expressions were increased in advanced CEAP stages (from tributary veins); on the other hand, *MMP9* and *TGF β 3* gene expressions were decreased in advanced CEAP stages (from the saphenofemoral junction and tributary veins, respectively).

MMP2 and *MMP9* have been long recognized as major contributors to proteolytic degradation of ECM [42]. Contrary to others' findings [20,23,26,43], no significant differences in gene expression of both gelatinases were found between healthy and CVeD veins, which is most probably due to the sample size. However, *MMP2* and *MMP9* gene expression seemed to evolve differently throughout CVeD clinical progression. This might be due to distinct response processes to different inflammatory cytokines/growth factors (other than TGF- β 1) during the hypertrophic phase. Also, *MMP9* (unlike *MMP2*) might have its preponderant proteolytic role in early CVeD stages rather than in advanced stages. This is coherent with previous studies in which an increase in plasma pro-*MMP9* activity (but not *MMP2*) was found in response to 30 min postural blood stasis in patients with varicose veins [21]. Nevertheless, the only significant result for *MMP9* was achieved in veins from the saphenofemoral region and this region might not be as reliable as the others for CVeD group comparisons (as proximal and distal segments of veins may be affected differently by the disease [19]).

The decrease in *TGF β 3* gene expression throughout CVeD clinical progression is consistent with our previous supposition. If a counter-regulation mechanism to control chronically elevated local levels of TGF- β 1 was in place, this coreceptor (whose main function is to regulate TGF- β 1 binding and signaling through its corresponding receptors) [5,44,45] may be part of the mechanism.

With respect to IHC results, it should be explained that the selection of proteins submitted to this technique was a consequence of previous qPCR results obtained from CVeD and healthy veins: it was assumed that the proteins with higher gene expression levels (*MMP2*, *TIMP2*, and *TGF β 2*) were most likely to present immunostaining differences. Our results showed that *MMP2*, *TIMP2*, and *TGF β 2* can be detected mainly in the tunica intima and media of healthy and varicose vein walls, although in a lower quantity in the latter. Lower levels of *MMP2*, *TIMP2*, and *TGF β 2* in varicose veins, when compared to controls, have been partially described by others [18,24] and are in accordance (particularly regarding tunica intima) with our qPCR results for similar comparisons (CVeD groups vs. control group).

Regarding IHC results between the CVeD groups, it is worth mentioning that these were not always coherent among anatomical regions, suggesting once more that comparisons among vein specimens harvested from different locations might not be reliable. Nevertheless, intima layer results (from all anatomical regions) were, in general, consistent with our qPCR results. *MMP2* presence in all tunicae was mainly unchanged between CVeD groups with one exception: at the saphenofemoral junction where a slightly lower presence was found in the CEAP4–6 group. This is coherent with the trend revealed with the qPCR results (Figure 3). In tributary veins, *MMP2* presence was generally unchanged between the two groups, while the qPCR results showed an increase in the CEAP4–6 group. This may be explained by the subjective nature of IHC results. With regard to *TIMP2* presence, the results are generally in line with Figure 3 trends, particularly for the tunica intima. Finally, the equally low presence of *TGF β 2* across CVeD groups was consistent with our qPCR findings,

reinforcing the idea of a counter-regulation mechanism to reduce local TGF- β 1 expression or signaling throughout CVeD clinical progression.

Whilst it has been suggested that MMP/TIMP imbalance could potentially work through elements (especially smooth muscles cells) in the tunica media [46], we highlight the importance of the tunica intima in CVeD pathophysiology, as shown by the coherence found between qPCR and IHC results for this tunica (in vein specimens from all anatomical regions). It was also noted that among the three anatomical vein regions, varicose tributary veins showed more evident differences (especially in qPCR results) between the CVeD groups, probably due to its thinner media. A thinner media tunica may make the venous walls more vulnerable to homeostatic upset induced by local hypertension, and therefore more prone to varicosity and premature morphologic changes.

4. Materials and Methods

4.1. Specimen Collection

Samples (2 cm length) of healthy great saphenous veins were harvested from the tibiotarsal junction of 13 patients undergoing coronary bypass surgery (control group). Samples of pathologic refluxing great saphenous veins (from the saphenofemoral and tibiotarsal junctions) and varicose tributaries (from veins showing tortuosity and significant diameter increase with blood filling at the thigh or leg), including the adventitia, were obtained from 31 patients submitted to surgical ablation of the great saphenous vein (CVeD group). The methods of harvesting, storage, and processing samples were identical in both groups.

Before collection, preoperative venous duplex ultrasonography was performed (to confirm venous reflux in CVeD samples and its non-existence in controls) and CVeD patients were evaluated according to the CEAP (Clinical, Etiologic, Anatomic and Pathophysiologic) classification [47] and then regrouped (CEAP2–3/CEAP4–6 groups). Subjects with the following conditions were excluded: surgery within the previous six weeks; steroids or intravenous drug use; deep vein thrombosis or thrombophlebitis; active infection; and collagen diseases and conditions that could modify leukocyte activity (e.g., diabetes mellitus, neoplasia, rheumatoid arthritis, vasculitis). After collection, all vein samples were aseptically washed free of blood using a physiological salt solution, immersed in RNA-Later (Ambion[®], Carlsbad, CA, USA), refrigerated at 4 °C for 24 h, then snap frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C until use.

In compliance with the Declaration of Helsinki, all the procedures carried out with human samples were approved by the Ethics Committee of “Cova da Beira University Hospital Centre, Covilhã, Portugal” (protocol No. 28/2009, 26 February 2009). Informed consent was obtained from all participants.

4.2. Conventional and Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction

Total ribonucleic acid (RNA) was isolated from 50 to 100 mg of tissue sample using the TRI Reagent (Ambion[®], Carlsbad, CA, USA) and following the manufacturer’s instructions. For complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) synthesis, 500 ng of total RNA was reverse transcribed using the M-MuLV Reverse Transcriptase kit (NZYTech[®], Lisbon, Portugal) in a final volume of 20 mL. Both procedures have been described elsewhere [30].

To confirm the gene expression of *MMP1*, *MMP2*, *MMP8*, *MMP9*, *MMP12*, *MMP13*, *TIMP1*, *TIMP2*, *TIMP3*, *TIMP4*, *TGF β 1*, *TGF β 2*, and *TGF β 3* in CVeD and healthy vein samples, conventional polymerase chain reactions (PCR) were performed using the NZYTaq DNA polymerase kit (NZYTech[®], Lisbon, Portugal) in accordance to the manufacturer’s instructions. PCR reactions were carried out in a final volume of 25 μ L containing 1 μ L synthesized cDNA, 0.1 μ L Taq DNA polymerase (5 U/ μ L), 0.625 μ L deoxyribonucleoside triphosphate solution (10 mM), 1.2 μ L sense and antisense primers (5 pmol/ μ L) for each gene (STABVIDA[®], Lisbon, Portugal; Table 3), 1.5 μ L MgCl₂ (50 mM), 16.875 μ L nuclease-free water, and 2.5 μ L 10 \times Taq DNA polymerase buffer. After initial heating at 95 °C for

5 min to denature the cDNA, 35 cycles (30 cycles for β -actin) of 30 s at 95 °C, annealing 30 s at 60 °C, and extension 30 s at 72 °C were carried out. The final cycle was followed by a period of 5 min at 72 °C to ensure that the amplified DNA was double-stranded. The integrity of cDNA samples was assessed by amplification of the β -actin housekeeping gene. The PCR products were electrophoresed on a 1% agarose gel and visualized with GreenSafe (NZYTech[®], Lisbon, Portugal) using UV light.

Table 3. Oligonucleotide sequences and amplicon sizes in conventional and quantitative real-time PCR. bp: base pairs.

Gene	Primer Sequence (5′–3′)	Amplicon Size (bp)
β -actin	Sense: CAT CCT CAC CCT GAA GTA CCC Antisense: AGC CTG GAT AGC AAC GTA CAT G	202
TIMP1	Sense: GAC GGC CTT CTG CAA TTC C Antisense: GTA TAA GGT GGT CTG GTT GAC TTC TG	79
TIMP2	Sense: GAG CCT GAA CCA CAG GTA CCA Antisense: AGG AGA TGT AGC ACG GGA TCA	77
TIMP3	Sense: CCA GGA CGC CTT CTG CAA Antisense: CCC CTC CTT TAC CAG CTT CTT C	73
TIMP4	Sense: CAG CCT CAG CAG CAC ATC TG Antisense: GGC CGG AAC TAC CTT CTC ACT	75
MMP1	Sense: AAG ATG AAA GGT GGA CCA ACA ATT Antisense: CCA AGA GAA TGG CCG AGT TC	70
MMP2	Sense: AAC TAC GAT GAC GAC CGC AAG T Antisense: AGG TGT AAA TGG GTG CCA TCA	142
MMP8	Sense: CAC TCC CTC AAG ATG ACA TCG A Antisense: ACG GAG TGT GGT GAT AGC ATC A	135
MMP9	Sense: AGG CGC TCA TGT ACC CTA TGT AC Antisense: GCC GTG GCT CAG GTT CA	111
MMP12	Sense: CGC CTC TCT GCT GAT GAC ATA C Antisense: GGT AGT GAC AGC ATC AAA ACT CAA A	136
MMP13	Sense: AAA TTA TGG AGG AGA TGC CCA TT Antisense: TCC TTG GAG TGG TCA AGA CCT AA	124
TGF β R1	Sense: ACG GCG TTA CAG TGT TCT G Antisense: GGT GTG GCA GAT ATA GAC C	358
TGF β R2	Sense: GCA GGT GGG AAC TGC AAG AT Antisense: GAA GGA CTC AAC ATT CTC CAA ATT C	76
TGF β R3	Sense: CTG TTC ACC CGA CCT GAA AT Antisense: CGT CAG GAG GCA CAC ACT TA	502

The gene expression of positively-confirmed MMP, TIMP, and TGF β R was determined by quantitative real-time PCR (qPCR) using gene-specific primers (STABVIDA[®], Lisbon, Portugal; Table 3) and SYBR-Green/Fluorescein qPCR Master Mix (Fermentas Life Sciences[®], Vilnius, Lithuania). β -actin housekeeping gene was used to normalize gene expression levels. The efficiency of the amplifications was determined for all primer sets using serial dilutions (1, 1:5 and 1:25) of cDNA. Primer concentrations and annealing temperatures were optimized, and the specificity of amplicons was determined by melting curve analysis.

The qPCR was performed as described elsewhere [30].

Both conventional and quantitative real-time PCR was carried out for a pool of specimen cDNA and then for each specimen separately.

Fold differences were calculated using the formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [48].

4.3. Immunohistochemistry

Vein specimens were fixed in 2% paraformaldehyde/0.2% glutaraldehyde for 24 h, transferred to a 70% alcohol solution and paraffin embedded the following day. Paraffin-embedded vein blocks were cut into 6 mm sections and mounted onto poly-L-lysine-coated slides.

Immunostaining of MMP2, TIMP2, and TGF β R2 was performed according to an optimized immunohistochemistry (IHC) protocol. Paraffin-embedded vein sections were deparaffinized, rehydrated, and pre-treated with Trilogy™ solution (Cell Marque®, Rocklin, CA, USA). Endogenous peroxidase activity was blocked by incubation in 3% (*v/v*) H₂O₂ for 10 min. Before and after incubation steps, the sections were washed twice for 5 min with Tris-buffered saline containing 0.1% Tween®-20 (Rockford, IL, USA) (TBS-T) at room temperature. Vein sections were incubated for 1 h with primary polyclonal rabbit antibodies against human MMP2 (1:700 dilution; ab38917, Abcam®, Cambridge, UK), TIMP2 (1:500 dilution; ab74216, Abcam®, Cambridge, UK), and TGF β R2 (1:500 dilution; ab61213, Abcam®, Cambridge, UK) at room temperature. A goat biotinylated anti-rabbit IgG (Vector Laboratories®, Burlingame, CA, USA) was used as secondary antibody. The specificity of the staining was accessed by omitting the primary antibody. After 10 min amplification and 10 min detection steps, the sections were then incubated in peroxidase substrate solution (diaminobenzidine) in a dark chamber for 10 min, counterstained with Mayer's hematoxylin for 3 min, rinsed for 10 min, and mounted for observation under a Zeiss LSM-710 laser scanning confocal microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

Staining was developed for the same period of time for each antibody, for both control and CVeD specimens, and was scored in a blinded manner by two independent observers. The final results took into account the staining intensity and relative difference between different groups of vein specimens (control, CEAP2–3, and CEAP4–6).

4.4. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed by means of IBM SPSS Statistics, (v.22.0, Armonk, NY, USA). Using data from subsamples (selected by quota sampling) of the 44 participants, statistically significant differences in gene expression among three (controls vs. CEAP2–3 vs. CEAP4–6) or two (CEAP2–3 vs. CEAP4–6) groups of participants were tested for. ANOVA (followed with Bonferroni tests) or the Student test was used to compare the means for independent groups. Equivalence between the groups, regarding participants' demographic and clinical features, was assessed using Fisher's exact test or its Freeman-Halton extension (for 2 × 3 contingency table) and Student test or ANOVA, as appropriate. To meet parametric assumptions, data were transformed using log₁₀(*x*) when necessary and outliers were controlled. Before violation of those assumptions, non-parametric tests (Kruskal–Wallis test, followed by the Mann-Whitney test) were performed. Data descriptive statistics are presented as (absolute and relative) frequencies, mean values ± standard error of the mean (SEM) and ranges. All tests were two-tailed and the significance was set at $p \leq 0.05$.

5. Conclusions

Whilst further studies about molecular events in varicose vein walls are required, our results have contributed more evidence on MMP/TIMP imbalance in venous walls throughout CVeD clinical progression, as well as on the role of TGF- β 1 in this event. Differences in MMP and TIMP expression should be expected not only among healthy, atrophic, and hypertrophic varicose veins, but also across anatomical vein regions. The full functional role of TGF- β 1 remains to be defined but our results regarding TGF β R expression may suggest a counter-regulation mechanism to control chronically elevated local levels of TGF- β 1, leading to a reduction in participation of this growth factor on MMP/TIMP imbalance throughout CVeD clinical progression.

These findings represent another step towards the understanding of CVeD pathophysiology and may provide some cues for therapeutic approaches targeting TGF- β 1 signaling.

Acknowledgments: We thank Manuel J. Antunes (Director of Cardiothoracic Surgery Department in Coimbra University Hospital Centre, Portugal) for kindly allowing us to use the hospital facilities so we could harvest vein samples used in this work, and to Hugh Warren (General Surgery Department, Queen Elizabeth Hospital King's Lynn, UK) who made valuable suggestions throughout the writing of the manuscript. This work was supported by a European Venous Forum Pump Priming Grant and by a pre-doctoral fellowship from Fundação para a Ciência e Tecnologia (SFRH/SINTD/60063/2009).

Author Contributions: Pedro Serralheiro—designed the project, recruited the patients, collected all the samples, performed the experiments, analyzed the data and drafted the manuscript. António Novais—performed the experiments and analyzed the data. Elisa Cairrão—designed the project, performed the experiments, analyzed the data and drafted the manuscript. Cláudio Maia—designed the project, analyzed the data and drafted the manuscript. Carlos M. Costa Almeida—designed the project, analyzed the data and drafted the manuscript. Ignacio Verde—designed the project, analyzed the data and drafted the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Visse, R.; Nagase, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.* **2003**, *92*, 827–839. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Rodriguez, D.; Morrison, C.J.; Overall, C.M. Matrix metalloproteinases: What do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1803*, 39–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Moore, C.S.; Crocker, S.J. An alternate perspective on the roles of TIMPs and MMPs in pathology. *Am. J. Pathol.* **2012**, *180*, 12–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Chen, Y.; Peng, W.; Raffetto, J.D.; Khalil, R.A. Matrix metalloproteinases in remodeling of lower extremity veins and chronic venous disease. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2017**, *147*, 267–299. [[PubMed](#)]
5. Weiss, A.; Attisano, L. The TGF- β superfamily signaling pathway. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **2013**, *2*, 47–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Verrecchia, F.; Mauviel, A. Transforming growth factor- β signaling through the Smad pathway: Role in extracellular matrix gene expression and regulation. *J. Invest. Dermatol.* **2002**, *118*, 211–215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Bergan, J. Molecular mechanisms in chronic venous insufficiency. *Ann. Vasc. Surg.* **2007**, *21*, 260–266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Pappas, P.J.; You, R.; Rameshwar, P.; Gorti, R.; DeFouw, D.O.; Phillips, C.K.; Padberg, F.T., Jr.; Silva, M.B., Jr.; Simonian, G.T.; Hobson, R.W., II; et al. Dermal tissue fibrosis in patients with chronic venous insufficiency is associated with increased transforming growth factor- β 1 gene expression and protein production. *J. Vasc. Surg.* **1999**, *30*, 1129–1145. [[CrossRef](#)]
9. Takase, S.; Pascarella, L.; Lerond, L.; Bergan, J.J.; Schmid-Schonbein, G.W. Venous hypertension, inflammation and valve remodeling. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **2004**, *28*, 484–493. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Serralheiro, P.; Soares, A.; Costa Almeida, C.M.; Verde, I. TGF- β 1 in vascular wall pathology: Unraveling chronic venous insufficiency pathophysiology. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2534. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Saharay, M.; Shields, D.A.; Georgiannos, S.N.; Porter, J.B.; Scurr, J.H.; Coleridge Smith, P.D. Endothelial activation in patients with chronic venous disease. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **1998**, *15*, 342–349. [[CrossRef](#)]
12. Saito, S.; Trovato, M.J.; You, R.; Lal, B.K.; Fasehun, F.; Padberg, F.T., Jr.; Hobson, R.W., II; Duran, W.N.; Pappas, P.J. Role of matrix metalloproteinases 1, 2, and 9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in chronic venous insufficiency. *J. Vasc. Surg.* **2001**, *34*, 930–938. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Pascarella, L.; Schmid-Schonbein, G.W.; Bergan, J. An animal model of venous hypertension: The role of inflammation in venous valve failure. *J. Vasc. Surg.* **2005**, *41*, 303–311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Ligi, D.; Mosti, G.; Croce, L.; Raffetto, J.D.; Mannello, F. Chronic venous disease—Part, II. Proteolytic biomarkers in wound healing. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1862*, 1900–1908. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Ligi, D.; Mosti, G.; Croce, L.; Raffetto, J.D.; Mannello, F. Chronic venous disease—Part, I. Inflammatory biomarkers in wound healing. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1862*, 1964–1974. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Mannello, F.; Ligi, D.; Canale, M.; Raffetto, J.D. Omics profiles in chronic venous ulcer wound fluid: Innovative applications for translational medicine. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2014**, *14*, 737–762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

17. Woodside, K.J.; Hu, M.; Burke, A.; Murakami, M.; Pounds, L.L.; Killewich, L.A.; Daller, J.A.; Hunter, G.C. Morphologic characteristics of varicose veins: Possible role of metalloproteinases. *J. Vasc. Surg.* **2003**, *38*, 162–169. [[CrossRef](#)]
18. Badier-Commander, C.; Verbeuren, T.; Lebard, C.; Michel, J.B.; Jacob, M.P. Increased TIMP/MMP ratio in varicose veins: A possible explanation for extracellular matrix accumulation. *J. Pathol.* **2000**, *192*, 105–112. [[CrossRef](#)]
19. Gillespie, D.L.; Patel, A.; Fileta, B.; Chang, A.; Barnes, S.; Flagg, A.; Kidwell, M.; Villavicencio, J.L.; Rich, N.M. Varicose veins possess greater quantities of MMP-1 than normal veins and demonstrate regional variation in MMP-1 and MMP-13. *J. Surg. Res.* **2002**, *106*, 233–238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Ishikawa, Y.; Asuwa, N.; Ishii, T.; Ito, K.; Akasaka, Y.; Masuda, T.; Zhang, L.; Kiguchi, H. Collagen alteration in vascular remodeling by hemodynamic factors. *Virchows Arch.* **2000**, *437*, 138–148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Jacob, M.P.; Cazaubon, M.; Scemama, A.; Prie, D.; Blanchet, F.; Guillin, M.C.; Michel, J.B. Plasma matrix metalloproteinase-9 as a marker of blood stasis in varicose veins. *Circulation* **2002**, *106*, 535–538. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Kosugi, I.; Urayama, H.; Kasashima, F.; Ohtake, H.; Watanabe, Y. Matrix metalloproteinase-9 and urokinase-type plasminogen activator in varicose veins. *Ann. Vasc. Surg.* **2003**, *17*, 234–238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Kowalewski, R.; Sobolewski, K.; Wolanska, M.; Gacko, M. Matrix metalloproteinases in the vein wall. *Int. Angiol.* **2004**, *23*, 164–169. [[PubMed](#)]
24. Parra, J.R.; Cambria, R.A.; Hower, C.D.; Dassow, M.S.; Freischlag, J.A.; Seabrook, G.R.; Towne, J.B. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is increased in the saphenofemoral junction of patients with varices in the leg. *J. Vasc. Surg.* **1998**, *28*, 669–675. [[CrossRef](#)]
25. Sansilvestri-Morel, P.; Fioretti, F.; Rupin, A.; Senni, K.; Fabiani, J.N.; Godeau, G.; Verbeuren, T.J. Comparison of extracellular matrix in skin and saphenous veins from patients with varicose veins: Does the skin reflect venous matrix changes? *Clin. Sci.* **2007**, *112*, 229–239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Sansilvestri-Morel, P.; Nonotte, I.; Fournet-Bourguignon, M.P.; Rupin, A.; Fabiani, J.N.; Verbeuren, T.J.; Vanhoutte, P.M. Abnormal deposition of extracellular matrix proteins by cultured smooth muscle cells from human varicose veins. *J. Vasc. Res.* **1998**, *35*, 115–123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Sansilvestri-Morel, P.; Rupin, A.; Jullien, N.D.; Lembrez, N.; Mestries-Dubois, P.; Fabiani, J.N.; Verbeuren, T.J. 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.* **2005**, *42*, 388–398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Chang, J.W.; Maeng, Y.H.; Kim, S.W. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -13 and tissue inhibitor of metalloproteinase-4 in varicose veins. *Korean J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **2011**, *44*, 387–391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Lim, C.S.; Davies, A.H. Pathogenesis of primary varicose veins. *Br. J. Surg.* **2009**, *96*, 1231–1242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Serralheiro, P.; Cairrao, E.; Maia, C.J.; Joao, M.; Almeida, C.M.; Verde, I. Effect of TGF- β 1 on MMP/TIMP and TGF- β 1 receptors in great saphenous veins and its significance on chronic venous insufficiency. *Phlebology* **2017**, *32*, 334–341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Overall, C.M.; Wrana, J.L.; Sodek, J. Independent regulation of collagenase, 72-kDa progelatinase, and metalloendoproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor- β . *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 1860–1869. [[PubMed](#)]
32. Kang, J.S.; Liu, C.; Derynck, R. New regulatory mechanisms of TGF- β receptor function. *Trends Cell Biol.* **2009**, *19*, 385–394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Raffetto, J.D.; Khalil, R.A. Mechanisms of varicose vein formation: Valve dysfunction and wall dilation. *Phlebology* **2008**, *23*, 85–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Nwomeh, B.C.; Liang, H.X.; Cohen, I.K.; Yager, D.R. MMP-8 is the predominant collagenase in healing wounds and nonhealing ulcers. *J. Surg. Res.* **1999**, *81*, 189–195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Xiao, Q.; Zhang, F.; Grassia, G.; Hu, Y.; Zhang, Z.; Xing, Q.; Yin, X.; Maddaluno, M.; Drung, B.; Schmidt, B.; et al. Matrix metalloproteinase-8 promotes vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2014**, *34*, 90–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

36. Jacob, T.; Hingorani, A.; Ascher, E. Overexpression of transforming growth factor- β 1 correlates with increased synthesis of nitric oxide synthase in varicose veins. *J. Vasc. Surg.* **2005**, *41*, 523–530. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Pascual, G.; Mendieta, C.; Garcia-Honduvilla, N.; Corrales, C.; Bellon, J.M.; Bujan, J. TGF- β 1 upregulation in the aging varicose vein. *J. Vasc. Surg.* **2007**, *44*, 192–201.
38. Pocock, E.S.; Alsaigh, T.; Mazor, R.; Schmid-Schonbein, G.W. Cellular and molecular basis of Venous insufficiency. *Vasc. Cell* **2014**, *6*, 24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Kowalewski, R.; Malkowski, A.; Gacko, M.; Sobolewski, K. Influence of thrombophlebitis on TGF- β 1 and its signaling pathway in the vein wall. *Folia Histochem. Cytobiol.* **2010**, *48*, 542–548. [[PubMed](#)]
40. Allison, M.A.; Cushman, M.; Callas, P.W.; Denenberg, J.O.; Jensky, N.E.; Criqui, M.H. Adipokines are associated with lower extremity venous disease: The San Diego population study. *J. Thromb. Haemost.* **2010**, *8*, 1912–1918. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Sprague, A.H.; Khalil, R.A. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *78*, 539–552. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Cui, N.; Hu, M.; Khalil, R.A. Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2017**, *147*, 1–73. [[PubMed](#)]
43. Badier-Commander, C.; Couvelard, A.; Henin, D.; Verbeuren, T.; Michel, J.B.; Jacob, M.P. Smooth muscle cell modulation and cytokine overproduction in varicose veins—An in situ study. *J. Pathol.* **2001**, *193*, 398–407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Goumans, M.J.; Liu, Z.; ten Dijke, P. TGF- β signaling in vascular biology and dysfunction. *Cell Res.* **2009**, *19*, 116–127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Ruiz-Ortega, M.; Rodriguez-Vita, J.; Sanchez-Lopez, E.; Carvajal, G.; Egido, J. TGF- β signaling in vascular fibrosis. *Cardiovasc. Res.* **2007**, *74*, 196–206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Aravind, B.; Saunders, B.; Navin, T.; Sandison, A.; Monaco, C.; Paleolog, E.M.; Davies, A.H. Inhibitory effect of TIMP influences the morphology of varicose veins. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **2010**, *40*, 754–765. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Eklof, B.; Rutherford, R.B.; Bergan, J.J.; Carpentier, P.H.; Gloviczki, P.; Kistner, R.L.; Meissner, M.H.; Moneta, G.L.; Myers, K.; Padberg, F.T.; et al. Revision of the CEAP classification for chronic venous disorders: Consensus statement. *J. Vasc. Surg.* **2004**, *40*, 1248–1252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Pfaffl, M.W.; Lange, I.G.; Daxenberger, A.; Meyer, H.H. Tissue-specific expression pattern of estrogen receptors (ER): Quantification of ER α and ER β mRNA with real-time RT-PCR. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* **2001**, *109*, 345–355. [[CrossRef](#)]




© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

4.2 Artigo II: Effect of TGF-beta1 on MMP/TIMP and TGF-beta1 receptors in great saphenous veins and its significance on chronic venous insufficiency

Effect of TGF- β 1 on MMP/TIMP and TGF- β 1 receptors in great saphenous veins and its significance on chronic venous insufficiency

Pedro Serralheiro^{1,2}, Elisa Cairrão², Cláudio J Maia², Marina João², Carlos M Costa Almeida^{3,4} and Ignacio Verde²

Phlebology
0(0) 1–8
© The Author(s) 2016
Reprints and permissions:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/0268355516655067
phl.sagepub.com


Abstract

Objectives: Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) may participate in local chronic inflammatory processes in varicose veins and in venous wall structure modifications through regulation of matrix metalloproteinases (MMP) and their inhibitors (tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)). The aim of this study was to analyze the effect of TGF- β 1 in the vein wall, namely on the gene expression of selected MMP, TIMP and TGF- β 1 receptors.

Methods: Healthy vein samples were harvested from eight subjects who underwent coronary bypass graft surgery with great saphenous vein. Each vein sample was divided into two segments, which were cultivated separately in vitro (one of the segments had TGF- β 1 added) and then submitted to gene expression analysis.

Results: In the TGF- β 1 supplemented group, there was a general increase in the mean gene expression. Specifically, expression of MMP9, MMP12, TIMP1 and TIMP2 were statistically significant.

Conclusion: The results of this study demonstrate that the gene expression of MMP9, MMP12, TIMP1 and TIMP2 was influenced by the addition of TGF- β 1. These results may be translated to chronic venous insufficiency framework and suggest involvement of TGF- β 1 in the vein wall pathology.

Keywords

Chronic venous insufficiency, matrix metalloproteinase, transforming growth factor- β 1, tissue inhibitor of metalloproteinase, vein wall

Introduction

Chronic venous insufficiency (CVI) is very frequent in the western world with the estimated prevalence of varicose vein disease at 5–30% in the adult population¹ and has a remarkable socioeconomic impact.² Despite vast research efforts aimed at defining the exact etiology and pathogenesis of this condition, the process of varicose vein genesis remains unclear.

A variety of mechanisms have been proposed for the etiology of CVI and much progress has recently been made. There are theories suggesting that venous hypertension leads to alterations at the molecular level which modify the venous wall and predispose to venous valvular insufficiency, which further increases local venous pressure thereby setting up a perpetual cycle.^{3–7} A number of studies reported that venous hypertension

may lead to leukocyte activation and to initiation of an inflammatory process at the venous level.^{3,4,6,7} A variety of molecules, such as transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), were suggested to be involved in the regulation of leukocyte recruitment and adhesion in the vein wall.^{3,5–8} Moreover, the relationship between

¹Department of General Surgery, Norfolk and Norwich University Hospital, UK

²Faculdade de Ciências da Saúde, University of Beira Interior, Portugal

³Department of General Surgery, Coimbra University Hospital Centre, Portugal

⁴Faculdade de Medicina, University of Coimbra, Portugal

Corresponding author:

Pedro Serralheiro, Department of General Surgery, Norfolk and Norwich University Hospital, Colney Ln, Norwich NR47UY, UK.
Email: p.serralheiro@gmail.com

varicose veins and the deregulation of matrix metalloproteinases (MMP) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) in the extracellular matrix has been acknowledged.⁵⁻⁸ It is possible that MMP and TIMP may be regulated by TGF- β 1.⁹

MMP are endopeptidases, synthesized by fibroblasts, vascular smooth muscle cells and leukocytes, which play an important role in the renewal of the extracellular matrix thus maintaining vein wall structure and function.¹⁰ Although the MMP level of expression is low in adult normal tissues, it may be quite elevated during tumoural invasion, inflammation, tissue repair and embryologic development processes.¹⁰ MMP are also known for breaking collagen macromolecules present in the extracellular matrix, responsible for maintenance of tissues architecture.¹⁰ The MMP activity can be inhibited by TIMP, namely TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 and TIMP-4.¹⁰

TGF- β , a mediator of the immune system, controls cellular differentiation and proliferation processes, the embryonic development and the apoptotic process. This cytokine has three different isoforms in mammals: TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3. TGF- β 1 is secreted by different cell types, including leukocytes, platelets and osteocytes and is a potent chemo-attractant of inflammatory cells.^{3,7,11} TGF- β 1 action may be related to its cell-localized receptors. There are three cellular receptors (TGF β R) for TGF- β 1: TGF β R1, TGF β R2 and TGF β R3.¹²⁻¹⁴ TGF β R1 is a membrane receptor that is recruited after TGF- β 1 binding to TGF β R2 (expressed constitutively). Active TGF β R2 (bound to TGF- β 1) phosphorylates TGF β R1 and heads the intracellular SMAD protein phosphorylation and the regulation of gene transcription. Therefore, TGF β R2 is essential for the cellular responsiveness to TGF- β 1. TGF β R3 is not a signal transducer and its function is to present TGF- β 1 to TGF β R2.¹²⁻¹⁴

It is of great value to show a clear relationship between TGF- β 1/TGF β R and MMP/TIMP in the vein wall, as it may bring important information for development of future pharmacological treatments for CVI. The aim of this article is to present a hypothesis for the initiation of the pathologic vein valve insufficiency processes in which TGF- β 1 modifies the gene expression of MMP, TIMP and TGF β R.

It reports a controlled experiment with cultured living tissue of healthy great saphenous vein, designed to analyze the effect of TGF- β 1 in the vein wall, namely on the gene expression of three MMP (MMP2, MMP9 and MMP12), TIMP (TIMP1, TIMP2, TIMP3 and TIMP4) and two TGF β R (TGF β R2 and TGF β R3).

Methods

Participants selection

As this was an exploratory study, an a priori sample size calculation was not performed. Vein samples were harvested from eight subjects submitted to coronary bypass with great saphenous vein.

To ensure the absence of venous insufficiency, the main exclusion criterion, all participants had their lower limbs previously analyzed, using venous duplex ultrasonography, which was performed with a 5-MHz transducer Toshiba Viamo 2010. To avoid biased results, subjects with the following conditions were also excluded from the study: previous surgery on the 6 weeks before; steroids use; history of intravenous drugs use; deep vein thrombosis or thrombophlebitis; active infection; collagen diseases and conditions that could modify leukocyte activity such as diabetes mellitus, neoplasia, rheumatoid arthritis or vasculitis.

In compliance with the Declaration of Helsinki, all the procedures carried out with human samples were approved by the Ethics Committee of "Centro Hospitalar da Cova da Beira" (Covilhã, Portugal) and obtained the informed consent from all participants.

Vein samples collection and culture

Eight samples of great saphenous vein, with 2 cm length, were harvested from the tibiotarsal joint region, aseptically washed from blood with a physiological salt solution and placed in 8 mL culture medium (RPMI 1640 GIBCO[®], containing: 20 mmol/L N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid, 10 U/mL penicillin, 10 μ g/mL streptomycin and 0.25 μ g/mL amphotericin B) for transport to laboratory.

In the laboratory, the samples were washed with an identical culture medium to the one used for transport. For each specimen, two segments of 5 mm \times 10 mm were opened and placed with the luminal face upwards in two different 60 mm \times 20 mm sterilized Petri dishes, pinned down on a base of 6 mm of hardened Sylgard 184 (Dow Corning[®]) with two 25-gauge needles and placed in a second culture medium (William's medium GIBCO[®], containing: 2 g/L sodium bicarbonate, 5 U/mL penicillin, 5 μ g/mL streptomycin, 2.5 μ g/mL gentamicin, 12.5 ng/mL amphotericin B, 2 mmol/L L-glutamine, 30% FBS) during 10 days at 37°C, in a static environment with 5% CO₂.^{15,16} A small channel on the Sylgard was made to allow adequate nutrition and to prevent tissue necrosis on the under surface of the veins wall. The culture medium was aseptically substituted every 2 days.¹⁷⁻²⁰ After 6 days of culture,

TGF- β 1 was added in a concentration of 10 ng/mL^{17–20} to one of the two samples of each specimen, while the other sample was kept in the same conditions and used as control. The samples were similarly cultivated during two more days and then submitted to gene expression analysis.^{17–20}

Gene expression analyzes

Total ribonucleic acid (RNA) extraction and complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) synthesis. Total RNA was isolated from 50 to 100 mg of tissue sample using the TRI reagent (Ambion[®], California, USA), following manufacturer's instructions. Samples were homogenized, centrifuged and washed with 75% ethanol. The quantity and quality of extracted RNA were assessed by spectrophotometry at 260 nm and 280 nm (Pharmacia Biotech, Ultraspec 3000, Cambridge, England) and 1% agarose gel electrophoresis, respectively.

For cDNA synthesis, 500 ng of total RNA was reverse transcribed using the M-MuLV Reverse Transcriptase kit (NZYTech[®], Lisboa, Portugal) in a final volume of 20 μ L. Briefly, cDNA synthesis reaction was initiated by a 10-min incubation at 25°C, followed by 60 min at 37°C and an inactivation step at 70°C for 15 min. Synthesized cDNA was stored at –20°C until further use.

Real time quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The gene expression of MMP2, MMP9, MMP12, TIMP1, TIMP2, TIMP3, TIMP4, TGF β 2 and TGF β 3 was determined by qPCR using gene specific primers (Table 1) and SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix kit (Fermentas Life Sciences[®]). β -actin housekeeping gene was used as internal control to normalize gene expression levels. The efficiency of amplifications was determined for all primer sets, using serial dilutions (1, 1:5 and 1:25) of synthesized cDNA. Primer concentration and annealing temperature for each primer set were optimized, and the specificity of amplicons was determined by melting curve analysis.

The qPCRs were carried out in a final volume of 20 μ L, containing 1 μ L of synthesized cDNA, 10 μ L of SYBR Green/Fluorescein, 1.2 μ L of sense and antisense primers (5 pmol/ μ L) for each gene and 6.6 μ L of nuclease-free water.

The samples were amplified with a iQ5 system (Bio-Rad, Hercules, CA) programmed as follows: 3-min denaturation at 95°C, followed by 30–35 cycles (depending on the primer used) of 10 s at 95°C, annealing 30 s at 60°C and extension 10 s at 72°C. The amplified qPCR fragments were analyzed by melting curves: reactions were heated from 55 to 95°C with 10 s holds

at each temperature (0.05°C/s). Fold differences were calculated following the mathematical model proposed by Pfaffl, using the formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.²¹

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics, v. 22.0 (Armonk, NY: IBM Corp). Student's paired t-tests were performed to analyze mean differences in gene expression between vein samples treated with TGF- β 1 and vein samples used as controls, and were followed by Cohen's *d* effect size calculation. To meet parametric assumptions, data were transformed using $\log_{10}(x)$ when necessary and outliers were controlled. Data descriptive statistics are presented as the mean value \pm standard error of the mean. All tests were two tailed and the significance was set at $P \leq .05$.

Results

The eight healthy great saphenous vein samples used in this study were harvested from participants with the following features: six men and two women, age 71.84 ± 2.83 (range: 54–81), BMI $26.08 \pm .79$ (range: 22.38–29.07) and free of attributes specified as exclusion criteria.

As illustrated in Figure 1, descriptive statistics results showed that gene expression mean values of all MMP, TIMP and TGF- β 1 receptors considered in this study, were higher in veins subjected to a culture to which was added TGF- β 1 than in control veins. In addition, the highest mean difference found was in TIMP1 gene expression.

Despite this general increase, only differences in gene expressions of MMP9 ($t_{(7)} = 2.530$, $P = .039$, $d = .89$), MMP12 ($t_{(7)} = 2.554$, $P = .038$, $d = .9$), TIMP1 ($t_{(7)} = 3.286$, $P = .013$, $d = 1.16$) and TIMP2 ($t_{(7)} = 2.497$, $P = .041$, $d = .88$), between healthy great saphenous veins cultured with and without TGF- β 1, were found statistically significant. Mean differences in gene expression of MMP2 ($t_{(7)} = 1.251$, $P = .251$, $d = .44$), TIMP3 ($t_{(7)} = 1.639$, $P = .145$, $d = .58$), TIMP4 ($t_{(7)} = 1.719$, $P = .129$, $d = .60$), TGF β 2 ($t_{(7)} = 1.631$, $P = .147$, $d = .58$) and TGF β 3 ($t_{(5)} = 1.304$, $P = .249$, $d = .53$) were not statistically significant.

Discussion

This study intended to add some evidence on the role of inflammatory process in CVI pathophysiology. MMP have been related to vein pathology, not only on

Table 1. Oligonucleotide sequences and amplicon size in PCRs.

Gene	Primer sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)
β -actin	Sense: CAT CCT CAC CCT GAA GTA CCC Antisense: AGC CTG GAT AGC AAC GTA CAT G	202
TIMP1	Sense: GAC GGC CTT CTG CAA TTC C Antisense: GTA TAA GGT GGT CTG GTT GAC TTC TG	79
TIMP2	Sense: GAG CCT GAA CCA CAG GTA CCA Antisense: AGG AGA TGT AGC ACG GGA TCA	77
TIMP3	Sense: CCA GGA CGC CTT CTG CAA Antisense: CCC CTC CTT TAC CAG CTT CTT C	73
TIMP4	Sense: CAG CCT CAG CAG CAC ATC TG Antisense: GGC CGG AAC TAC CTT CTC ACT	75
MMP1	Sense: AAG ATG AAA GGT GGA CCA ACA ATT Antisense: CCA AGA GAA TGG CCG AGT TC	70
MMP2	Sense: AAC TAC GAT GAC GAC CGC AAG T Antisense: AGG TGT AAA TGG GTG CCA TCA	142
MMP8	Sense: CAC TCC CTC AAG ATG ACA TCG A Antisense: ACG GAG TGT GGT GAT AGC ATC A	135
MMP9	Sense: AGG CGC TCA TGT ACC CTA TGT AC Antisense: GCC GTG GCT CTG GAT CA	111
MMP12	Sense: CGC CTC TCT GCT GAT GAC ATA C Antisense: GGT AGT GAC AGC ATC AAA ACT CAA A	136
MMP13	Sense: AAA TTA TGG AGG AGA TGC CCA TT Antisense: TCC TTG GAG TGG TCA AGA CCT AA	124
TGF β R1	Sense: ACG GCG TTA CAG TGT TCT G Antisense: GGT GTG GCA GAT ATA GAC C	358
TGF β R2	Sense: GCA GGT GGG AAC TGC AAG AT Antisense: GAA GGA CTC AAC ATT CTC CAA ATT C	76
TGF β R3	Sense: CTG TTC ACC CGA CCT GAA AT Antisense: CGT CAG GAG GCA CAC ACT TA	502

bp: base pairs.

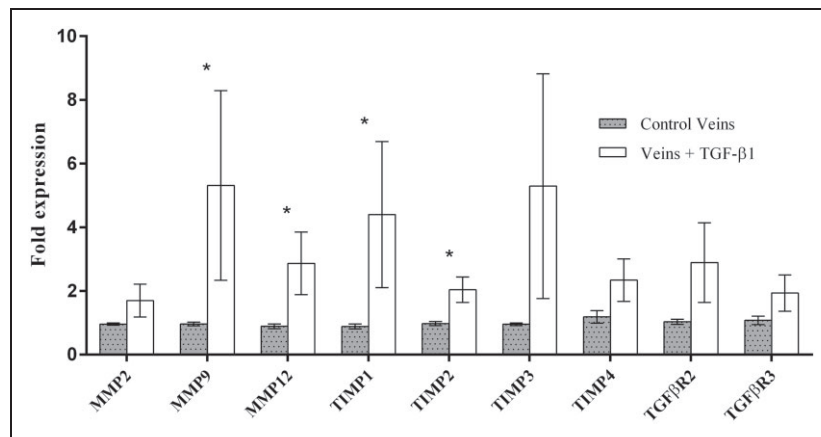


Figure 1. Proteins expression in great saphenous healthy veins before and after adding TGF- β 1. Proteins expression was determined by qPCR, after normalization with β -actin housekeeping gene. All results are expressed as fold expression. Error bars indicate mean \pm SEM, n(control) = 8 and n(with TGF- β 1) = 8. * P \leq .05.

CVI^{22,23} but also on haemorrhoidal disease,²⁴ deep vein thrombosis^{25,26} and non healing venous ulcers.²⁷ It is an emergent field of study that should be addressed and developed.

TGF- β 1 (an extremely important cytokine on the inflammatory process) might be related to the venous wall structural modification of insufficient veins. This process is mainly due to deregulation of collagen, elastin, fibronectin and laminin production in the vein wall, which in turn is known to be related to deregulation of MMP and TIMP in the extracellular matrix.⁵⁻⁸ Numerous studies have suggested a link between TGF- β 1 and the MMP/TIMP balance in a variety of pathologies.²⁸⁻⁴¹

In the present study, a controlled experiment was set up to prove the direct effect of TGF- β 1 on MMP (MMP2, MMP9 and MMP12), TIMP (TIMP1, TIMP2, TIMP3 and TIMP4) and TGF- β 1 receptors (TGF β R2 and TGF β R3). As opposed to TIMP (that were all studied), specific MMP were chosen owing to previous published studies^{8,42-51} and to our preliminary genetic results, which showed that the most likely MMP to intervene in venous insufficiency would be MMP2, MMP9 and MMP12. TGF β R2 and TGF β R3 were added to the current study as we hypothesized that TGF- β 1 effect on MMP/TIMP balance could depend on TGF- β 1 receptors. TGF β R1 was excluded from the study as our previous genetic results revealed negligible amounts of this receptor in either varicose veins or healthy veins.

The choice for using normal veins was based on the assumption that the use of varicose veins would not allow the assessment of TGF- β 1 influence on the vein pathology onset. Our preliminary genetic studies led us to believe that prior pathologic MMP, TIMP and TGF β R fluctuations may decrease the TGF- β 1 effect within the venous wall. When compared with normal veins, varicose veins present modified MMP, TIMP and TGF β R patterns, which are probably due to previous high local levels of inflammatory cytokines.

We found statistically significant differences in gene expressions of MMP9, MMP12, TIMP1 and TIMP2 between healthy great saphenous veins treated with TGF- β 1 and controls, though gene expressions mean values of all MMP and TIMP increased after adding TGF- β 1. Such fact, if not due to the low number of participants, may suggest a differentiated action of TGF- β 1 among different proteins, meaning that this cytokine could intervene more markedly on MMP9, MMP12, TIMP1 and TIMP2.

We did not find statistically significant differences on TGF β R2 nor on TGF β R3 gene expressions, despite the higher mean values in samples treated with TGF- β 1. Once again, this fact may be due to the low number of participants or to the fact that these enzymes may

intervene later in the pathophysiologic process, after the atrophic phase of the vein wall.

Although these results were obtained on normal veins, they can be translated to the framework of CVI as they demonstrate how TGF- β 1 may modify normal veins and, consequently, suggest an hypothesis for the venous pathology onset. The fact that varicose veins present different amounts of MMP and TIMP within their wall, when compared with normal veins,^{8,42-51} may suggest that local increased TGF- β 1 activity and chronic inflammation, caused by persistent ambulatory venous hypertension, can intervene on the molecular pathway of fibrosis/atrophy (through MMP/TIMP balance deregulation) in varicose veins wall. As we believe TGF- β 1 may act differently at different phases of the disease resulting in whether atrophy (increase of extracellular matrix degradation) or fibrosis (decrease of extracellular matrix degradation), the net proteolytic activity was not assessed at this simulated acute inflammatory phase.

The current study presents strengths and weaknesses that should be pointed out. On the one hand, this is to our knowledge the first totally controlled study showing a direct intervention of TGF- β 1 on MMP and TIMP gene expression in great saphenous veins. As explained before, each pair of the compared veins segments were taken from the same patient, setting aside the interpersonal genetic variability. As they were placed in an equal aseptically controlled environment (to avoid any other exogenous source of MMP or TIMP) and prepared for genetic study with RNA extraction, cDNA synthesis and qPCR at exactly same time, variability due to laboratory-specific errors was also minimized.

On the other hand, there are a few limitations that should be addressed in future studies. First and foremost, the sample size is small, owing to the fact that this work was included in a broader research work and to a complex process of sample collection. Second, female gender is underrepresented (only two women were among the participants) due to the ethical strategy used to obtain healthy vein samples and the fact that the prevalence of women with coronary heart disease that need a coronary bypass (surgical context used to harvest samples) is lower than men. Knowing that women have a higher prevalence of varicose veins when compared with men, it would be preferable to have more women than men in our sample. Finally, it is important to stress that our results relate to gene expression of proteins and the latter may not be directly related to protein production or protein activity. As per aforementioned, all findings should be considered exploratory and further studies with a larger sample should be carried out to validate our results.

Conclusion

This in vitro study with healthy great saphenous vein confirmed a direct intervention of TGF- β 1 on the gene expression of MMP9, MMP12, TIMP1 and TIMP2 (increasing all of them). Our exploratory findings may suggest the involvement of TGF- β 1 on the molecular pathologic response in the vein wall. Within the framework of CVI, these results may have some importance, inasmuch as they show a possible relationship between the inflammatory process and the molecular pathway of fibrosis/atrophy in varicose vein wall, and therefore should promote further studies to better understand this pathologic process.

Acknowledgements

We would like to thank Manuel J. Antunes MD, PhD, DSc (Director of Cardiothoracic Surgery Department in Coimbra University Hospital Centre, Portugal) for kindly allowing us to use the Hospital facilities, so that we could harvest the vein samples used in this work. In compliance with the Declaration of Helsinki, all the procedures carried out with human samples were approved by the Ethics Committee of "Centro Hospitalar da Cova da Beira" (Covilhã, Portugal) and obtained the informed consent from every participant.

Authors' contributions

PS was involved in literature research, study design, protocol development, gaining ethical approval, patient recruitment, sample harvest, lab procedures, data analysis and writing the first draft of the manuscript. EC was involved in study design, protocol development and lab procedures. CM was involved in protocol development and data analysis. MJ was involved in laboratory procedures. CCA was involved in patient recruitment and literature research. IV was involved in literature research, study design and data analysis. All authors reviewed and edited the manuscript and approved the final version of the manuscript.

Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was supported by a European Venous Forum Pump Priming Grant and by a pre-doctoral fellowship from Fundação para a Ciência e Tecnologia (SFRH/SINTD/60063/2009).

References

1. Eberhardt RT and Raffetto JD. Chronic venous insufficiency. *Circulation* 2014; 130: 333–346.

2. Da Silva A, Navarro MF and Batalheiro J. [The importance of chronic venous insufficiency. Various preliminary data on its medico-social consequences]. *Phlebologie* 1992; 45: 439–443.
3. Bergan J. Molecular mechanisms in chronic venous insufficiency. *Ann Vasc Surg* 2007; 21: 260–266.
4. Pascarella L, Schmid-Schonbein GW and Bergan J. An animal model of venous hypertension: the role of inflammation in venous valve failure. *J Vasc Surg* 2005; 41: 303–311.
5. Saharay M, Shields DA, Georgiannos SN, et al. Endothelial activation in patients with chronic venous disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1998; 15: 342–349.
6. Saito S, Trovato MJ, You R, et al. Role of matrix metalloproteinases 1, 2, and 9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in chronic venous insufficiency. *J Vasc Surg* 2001; 34: 930–938.
7. Takase S, Pascarella L, Lerond L, et al. Venous hypertension, inflammation and valve remodeling. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004; 28: 484–493.
8. Woodside KJ, Hu M, Burke A, et al. Morphologic characteristics of varicose veins: possible role of metalloproteinases. *J Vasc Surg* 2003; 38: 162–169.
9. Overall CM, Wrana JL and Sodek J. Independent regulation of collagenase, 72-kDa progelatinase, and metalloendoproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 1989; 264: 1860–1869.
10. Visse R and Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92: 827–839.
11. Pappas PJ, You R, Rameshwar P, et al. Dermal tissue fibrosis in patients with chronic venous insufficiency is associated with increased transforming growth factor-beta1 gene expression and protein production. *J Vasc Surg* 1999; 30: 1129–1145.
12. Goumans MJ, Liu Z and ten Dijke P. TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction. *Cell Res* 2009; 19: 116–127.
13. Kowalewski R, Malkowski A, Gacko M, et al. Influence of thrombophlebitis on TGF-beta1 and its signaling pathway in the vein wall. *Folia Histochem Cytobiol* 2010; 48: 542–548.
14. Ruiz-Ortega M, Rodriguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, et al. TGF-beta signaling in vascular fibrosis. *Cardiovasc Res* 2007; 74: 196–206.
15. Eton D, Terramani TT, Wang Y, et al. Genetic engineering of stent grafts with a highly efficient pseudotyped retroviral vector. *J Vasc Surg* 1999; 29: 863–873.
16. Yu H, Kumar SR, Tang L, et al. Injury induced neointima formation and its inhibition by retrovirus-mediated transfer of nitride oxide synthase gene in an in-vitro human saphenous vein culture model. *Atherosclerosis* 2002; 161: 113–122.
17. Brandl A, Angele P, Roll C, et al. Influence of the growth factors PDGF-BB, TGF-beta1 and bFGF on the replicative aging of human articular chondrocytes during in vitro expansion. *J Orthop Res* 2010; 28: 354–360.
18. Poleni PE, Etienne S, Velot E, et al. Activation of PPARs alpha, beta/delta, and gamma impairs TGF-beta1-

- induced collagens' production and modulates the TIMP-1/MMPs balance in three-dimensional cultured chondrocytes. *PPAR Res* 2010; 2010: 635912.
19. Tezcan B, Serter S, Kiter E, et al. Dose dependent effect of C-type natriuretic peptide signaling in glycosaminoglycan synthesis during TGF- β 1 induced chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Mol Histol* 2010; 41: 247–258.
 20. Williams GM, Dills KJ, Flores CR, et al. Differential regulation of immature articular cartilage compressive moduli and Poisson's ratios by in vitro stimulation with IGF-1 and TGF- β 1. *J Biomech* 2010; 43: 2501–2507.
 21. Pfaffl MW, Lange IG, Daxenberger A, et al. Tissue-specific expression pattern of estrogen receptors (ER): quantification of ER alpha and ER beta mRNA with real-time RT-PCR. *APMIS* 2001; 109: 345–355.
 22. Lim CS and Davies AH. Pathogenesis of primary varicose veins. *Br J Surg* 2009; 96: 1231–1242.
 23. Serra R, Buffone G, Costanzo G, et al. Altered metalloproteinase-9 expression as least common denominator between varicocele, inguinal hernia, and chronic venous disorders. *Ann Vasc Surg* 2014; 28: 705–709.
 24. Serra R, Gallelli L, Grande R, et al. Hemorrhoids and matrix metalloproteinases: A multicenter study on the predictive role of biomarkers. *Surgery* 2016; 159: 487–494.
 25. de Francis S, Gallelli L, Amato B, et al. Plasma MMP and TIMP evaluation in patients with deep venous thrombosis: could they have a predictive role in the development of post-thrombotic syndrome? *Int Wound J* 2015. DOI: 10.1111/iwj.12489.
 26. de Francis S and Serra R. Matrix metalloproteinases and endothelial dysfunction: The search for new prognostic markers and for new therapeutic targets for vascular wall imbalance. *Thromb Res* 2015; 136: 5–6.
 27. Amato B, Coretti G, Compagna R, et al. Role of matrix metalloproteinases in non-healing venous ulcers. *Int Wound J* 2015; 12: 641–645.
 28. Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ, et al. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J* 1987; 6: 1899–1904.
 29. Esteve PO, Tremblay P, Houde M, et al. In vitro expression of MMP-2 and MMP-9 in glioma cells following exposure to inflammatory mediators. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1403: 85–96.
 30. Itoh H, Kishore AH, Lindqvist A, et al. Transforming growth factor beta1 (TGF β 1) and progesterone regulate matrix metalloproteinases (MMP) in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: E888–E897.
 31. Jacob T, Hingorani A and Ascher E. Overexpression of transforming growth factor- β 1 correlates with increased synthesis of nitric oxide synthase in varicose veins. *J Vasc Surg* 2005; 41: 523–530.
 32. Kobayashi T, Kim H, Liu X, et al. Matrix metalloproteinase-9 activates TGF- β and stimulates fibroblast contraction of collagen gels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2014; 306: L1006–L1015.
 33. Leask A and Abraham DJ. TGF- β signaling and the fibrotic response. *FASEB J* 2004; 18: 816–827.
 34. Marti HP, Lee L, Kashgarian M, et al. Transforming growth factor- β 1 stimulates glomerular mesangial cell synthesis of the 72-kd type IV collagenase. *Am J Pathol* 1994; 144: 82–94.
 35. Nicolaides AN. Chronic venous disease and the leukocyte-endothelium interaction: from symptoms to ulceration. *Angiology* 2005; 56(Suppl 1): S11–S19.
 36. Pascual G, Mendieta C, Garcia-Honduvilla N, et al. TGF- β 1 upregulation in the aging varicose vein. *J Vasc Res* 2007; 44: 192–201.
 37. Ren JG, Chen G, Zhu JY, et al. Downregulation of the transforming growth factor- β /connective tissue growth factor 2 signalling pathway in venous malformations: its target potential for sclerotherapy. *Br J Dermatol* 2014; 171: 242–251.
 38. Rizzi E, Ceron CS, Guimaraes DA, et al. Temporal changes in cardiac matrix metalloproteinase activity, oxidative stress, and TGF- β in renovascular hypertension-induced cardiac hypertrophy. *Exp Mol Pathol* 2013; 94: 1–9.
 39. Schmid-Schonbein GW, Takase S and Bergan JJ. New advances in the understanding of the pathophysiology of chronic venous insufficiency. *Angiology* 2001; 52(Suppl 1): S27–S34.
 40. Verrecchia F and Mauviel A. Transforming growth factor- β signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 211–215.
 41. Zhang H, Wang ZW, Wu HB, et al. Transforming growth factor- β 1 induces matrix metalloproteinase-9 expression in rat vascular smooth muscle cells via ROS-dependent ERK-NF- κ B pathways. *Mol Cell Biochem* 2013; 375: 11–21.
 42. Badier-Commander C, Verbeuren T, Lebard C, et al. Increased TIMP/MMP ratio in varicose veins: a possible explanation for extracellular matrix accumulation. *J Pathol* 2000; 192: 105–112.
 43. Gillespie DL, Patel A, Fileta B, et al. Varicose veins possess greater quantities of MMP-1 than normal veins and demonstrate regional variation in MMP-1 and MMP-13. *J Surg Res* 2002; 106: 233–238.
 44. Ishikawa Y, Asuwa N, Ishii T, et al. Collagen alteration in vascular remodeling by hemodynamic factors. *Virchows Archiv* 2000; 437: 138–148.
 45. Jacob MP, Cazaubon M, Scemama A, et al. Plasma matrix metalloproteinase-9 as a marker of blood stasis in varicose veins. *Circulation* 2002; 106: 535–538.
 46. Kosugi I, Urayama H, Kasashima F, et al. Matrix metalloproteinase-9 and urokinase-type plasminogen activator in varicose veins. *Ann Vasc Surg* 2003; 17: 234–238.
 47. Kowalewski R, Sobolewski K, Wolanska M, et al. Matrix metalloproteinases in the vein wall. *Int Angiol* 2004; 23: 164–169.
 48. Parra JR, Cambria RA, Hower CD, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is increased in the saphenofemoral junction of patients with varices in the leg. *J Vasc Surg* 1998; 28: 669–675.
 49. Sansilvestri-Morel P, Fioretti F, Rupin A, et al. Comparison of extracellular matrix in skin and saphenous veins from patients with varicose veins: does the

- skin reflect venous matrix changes? *Clin Sci* 2007; 112: 229–239.
50. Sansilvestri-Morel P, Nonotte I, Fournet-Bourguignon MP, et al. Abnormal deposition of extracellular matrix proteins by cultured smooth muscle cells from human varicose veins. *J Vasc Res* 1998; 35: 115–123.
51. Sansilvestri-Morel P, Rupin A, Jullien ND, et al. 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* 2005; 42: 388–398.

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador- β 1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

4.3 Artigo III: *TGF- β 1 in Vascular Wall Pathology: Unraveling Chronic Venous Insufficiency Pathophysiology*



Review

TGF- β 1 in Vascular Wall Pathology: Unraveling Chronic Venous Insufficiency Pathophysiology

Pedro Serralheiro ^{1,2,*} , Andreia Soares ¹, Carlos M. Costa Almeida ³ and Ignacio Verde ²

¹ Norfolk and Norwich University Hospital, Colney Ln, Norwich NR47UY, UK; andreamsoares2@gmail.com

² Faculty of Health Sciences, CICS-UBI—Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Av. Infante D. Henrique, 6201-506 Covilhã, Portugal; iverde@fcsaude.ubi.pt

³ Department of General Surgery (C), Coimbra University Hospital Centre, Portugal; Faculty of Medicine, University of Coimbra, Praceta Prof. Mota Pinto, 3000-075 Coimbra, Portugal; c.m.costa.almeida@gmail.com

* Correspondence: pedro.serralheiro@nnuh.nhs.uk; Tel.: +44-1603-286-286

Received: 14 October 2017; Accepted: 22 November 2017; Published: 26 November 2017

Abstract: Chronic venous insufficiency and varicose veins occur commonly in affluent countries and are a socioeconomic burden. However, there remains a relative lack of knowledge about venous pathophysiology. Various theories have been suggested, yet the molecular sequence of events is poorly understood. Transforming growth factor-beta one (TGF- β 1) is a highly complex polypeptide with multifunctional properties that has an active role during embryonic development, in adult organ physiology and in the pathophysiology of major diseases, including cancer and various autoimmune, fibrotic and cardiovascular diseases. Therefore, an emphasis on understanding its signaling pathways (and possible disruptions) will be an essential requirement for a better comprehension and management of specific diseases. This review aims at shedding more light on venous pathophysiology by describing the TGF- β 1 structure, function, activation and signaling, and providing an overview of how this growth factor and disturbances in its signaling pathway may contribute to specific pathological processes concerning the vessel wall which, in turn, may have a role in chronic venous insufficiency.

Keywords: chronic venous insufficiency; growth factors; signal transduction; TGF- β 1; inflammation

1. Introduction

The term chronic venous disorder (CvD) includes the full spectrum of morphological and functional abnormalities of the venous system, from telangiectasia to venous ulcers. Functional abnormalities of the veins of the lower extremities producing edema, skin changes, or venous ulcers are clinically known as chronic venous insufficiency (CVI)—a term reserved for advanced CvD [1].

Although it is extremely common, the exact prevalence of CvD remains elusive. Reports of prevalence of CVI vary from <1% to 40% in females and from <1% to 17% in males [2]. Prevalence estimates for varicose veins are even higher, <1% to 73% in females and 2% to 56% in males [3,4]. Several factors, unrelated to actual differences in population frequency, account for some of the variation in the prevalence estimations: accuracy in application of diagnostic criteria, quality and availability of medical diagnostic and treatment resources, or variations in samples composition with respect to age, race, gender and geographic location [2,5]. CVI not only affects a significant proportion of the population, but also causes considerable morbidity and adversely impacts the quality of life of those affected. All of these factors have an influence on health-care budgets and public spending [6,7].

The recurrent nature of the disease, the socioeconomic burden and the ineffectiveness of current treatment modalities emphasize the need for more CVI-related research. Several theories about venous pathophysiology and varicosities genesis in the lower limbs (e.g., venous stasis theory, arteriovenous fistula theory, diffusion block theory) are outdated or have been refuted [8].

More recent hypotheses proposed that a dysfunctional venous system follows venous wall and valvular damage, which are triggered by venous hypertension and are the result of sterile inflammatory reactions [8–13]. However, the molecular sequence of events that lead to venous wall remodeling and structural weakness is yet poorly understood. It has been suggested that venous hypertension and/or wall hypoxia originates endothelial activation and expression of growth factors, adhesion and signaling molecules, which lead to leukocyte activation and migration [9,12–14]. This inflammatory process is responsible for the secretion of mediators that may trigger a local dysregulation of metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases (MMP/TIMP) ratio that prompts abnormalities in extracellular matrix (ECM) structure, leading to decreased elasticity and increased distensibility of the venous wall [11–13,15–17]. Tissue remodeling is a complex process that is controlled by a great variety of factors, including transforming growth factor beta one (TGF- β 1) [15,18,19].

TGF- β 1 is a highly complex polypeptide with a key role in the regulation of cell function (including proliferation, differentiation, migration and apoptosis) and physiological processes (including embryonic development, angiogenesis and wound healing) [20,21]. Not surprisingly, disruptions in TGF- β 1 signaling have been associated with a wide range of human diseases such as cancer and various autoimmune, fibrotic and cardiovascular diseases [20]. Therefore an emphasis on understanding its signaling pathways (and possible disruptions) may be of great importance in the comprehension and management of specific diseases.

Aimed at shedding more light on the processes involved in venous pathophysiology, this review will focus on describing TGF- β 1 structure, function, activation and signaling, and on providing an overview of how TGF- β 1 and disturbances in its signaling pathways may contribute to specific pathological processes in the vessel wall which, in turn, may have a role in CVI.

2. TGF- β 1 Family and Function

TGF- β 1 is a highly complex polypeptide that belongs to the superfamily TGF- β , which contains more than 30 structurally related polypeptide growth factors in mammals. In general, the family members are subdivided into two functional groups: (I) the TGF- β like group that includes TGF- β (1 to 3), activins, inhibins and some growth differentiation factors (GDF); (II) the bone morphogenetic proteins (BMP) like group comprising BMPs, most GDFs and anti-müllerian hormone (AMH) [21]. The TGF- β superfamily members share a conserved cysteine knot structure, are ubiquitously expressed in diverse tissues and function during the earliest stages of development and throughout the lifetime of humans [21]. Disturbances in TGF- β superfamily pathways, including either germ-line or somatic mutations or alterations in the expression of members of these signaling pathways, often result in several pathological conditions [22,23].

TGF- β 1 is the most important isoform of the family in the cardiovascular system and is present in endothelial cells (EC), vascular smooth muscle cells (VSMC), myofibroblasts, macrophages and other hematopoietic cells [24].

Knockout studies of TGF- β 1 signaling components in mice offered the first indication of their critical role in vascular development and function [20]. Both EC and their supporting cells (VSMC and pericytes) are needed to form a mature vascular network and TGF- β 1 has been proposed not only to affect EC and VSMC (e.g., their proliferation, differentiation, migration), but also to regulate the interaction between them [25–27]. TGF- β 1 is able to act as a promoting and an inhibitory factor of angiogenesis.

In addition to the angiogenic effect, TGF- β 1 can induce a process called endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT), by which EC lose apical-basal polarity and acquire a mesenchymal migratory phenotype [28]. EndMT is essential during embryonic development and tissue regeneration/wound healing, playing a role in pathological conditions like fibrosis or contributing to the generation of cancer-associated fibroblasts that are known to influence the tumor-microenvironment favorable for tumor cells [29].

TGF- β 1 has also been shown to be a key regulator of ECM synthesis and remodeling. Specifically, it has the ability to induce the expression and deposition of ECM proteins, as well as to stimulate the production of protease inhibitors that prevent their enzymatic breakdown [4,19,30–33]. Abnormalities found on the structural matrix components (e.g., collagen, elastin) and the resultant increasing of ECM stiffness/loss of elasticity are common observations in cardiovascular [34] and venous diseases [35]. Therefore, the participation of TGF- β 1 in the pathogenesis of vascular pathologies associated with matrix remodeling and fibrosis is not surprising [22].

The widespread expression profile of TGF- β receptors in all immune cell types suggests TGF- β 1 participation in broad activities of the immune system [36]. According to Goumans et al., it delicately regulates the tolerogenic versus immunogenic arms of the immune system to balance adequate host defense while limiting collateral inflammatory tissue damage [26].

It is worth mentioning that this multifunctional growth factor is also known by its dual action. Indeed, the TGF- β 1-elicited response is highly context-dependent throughout development and across different tissues. For instance, some authors reported that TGF- β 1 protects bovine aortic EC from apoptosis [37], in contrast, others showed the opposite effect on porcine microvascular EC [37,38]. While at early stages of tissue repair TGF- β 1, as a major orchestrator of the fibroproliferative response, stimulates the chemotaxis of repair cells, modulates immunity and inflammation, and induces matrix production; at later stages, it negatively regulates fibrosis through its strong antiproliferative and apoptotic effects on fibrotic cells [39,40]. Likewise, a dual role of TGF- β in the tumor microenvironment was described; it seems to prevent tumor growth and angiogenesis at early phases of tumor development, whereas it has pro-angiogenic and tumor promotion activities at late-stages of tumor progression [41,42]. Moreover, numerous *in vitro* studies also showed a dose-dependent (and timing-dependent) action of TGF- β 1; for example, EC invasion and capillary lumen formation are inhibited by high concentrations of TGF- β 1, whereas lower concentrations potentiate the effects of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor induced invasion [43,44].

3. TGF- β 1 Signaling Pathways: Major Components and Regulation

3.1. TGF- β 1 Latent Complexes

TGF- β 1 (Figure 1) is synthesized as an inactive protein precursor (i.e., a pre-pro-protein) consisting of a signal peptide, an N-terminal prodomain and a C-terminal biologically active peptide [21,33,45]. Early on, it was realized that TGF- β 1 is secreted from cells in a latent complex with its prodomain (latency-associated peptide or LAP) [32,46], indicating that during synthesis non-covalent interactions are formed between the prodomain and the mature domain, and a small latent complex (SLC) comes to existence. During the secretory process, the prodomain of TGF- β 1 interacts covalently with a latent TGF- β -binding protein (LTBP) to form a large latent complex (LLC) which is then secreted into the ECM [4,32,33,47,48]. LTBP associates with TGF- β 1 prodomain via signature 8-Cys region, which is unique to those proteins (Figure 1).

LTBP is required for secretion and correct folding of TGF- β 1. The association with LTBP results in the storage of latent TGF- β 1 in ECM structures rapidly after secretion [19,46,47,49]. It remains inactive in these structures (disulfide bond prevents it from binding to its receptors) until there is a proteolytic cleavage of LAP or a conformational change in LAP (induced by contractile forces)—critical events for protein activation [30,48,50].

In summary, latent complexes act to control TGF- β 1 activity by sequestering it in the ECM or by mediating interactions with integrin receptors to release the mature peptide [50]. Thus, aberrant expression of the binding proteins can result in improper TGF- β 1 signaling [23].

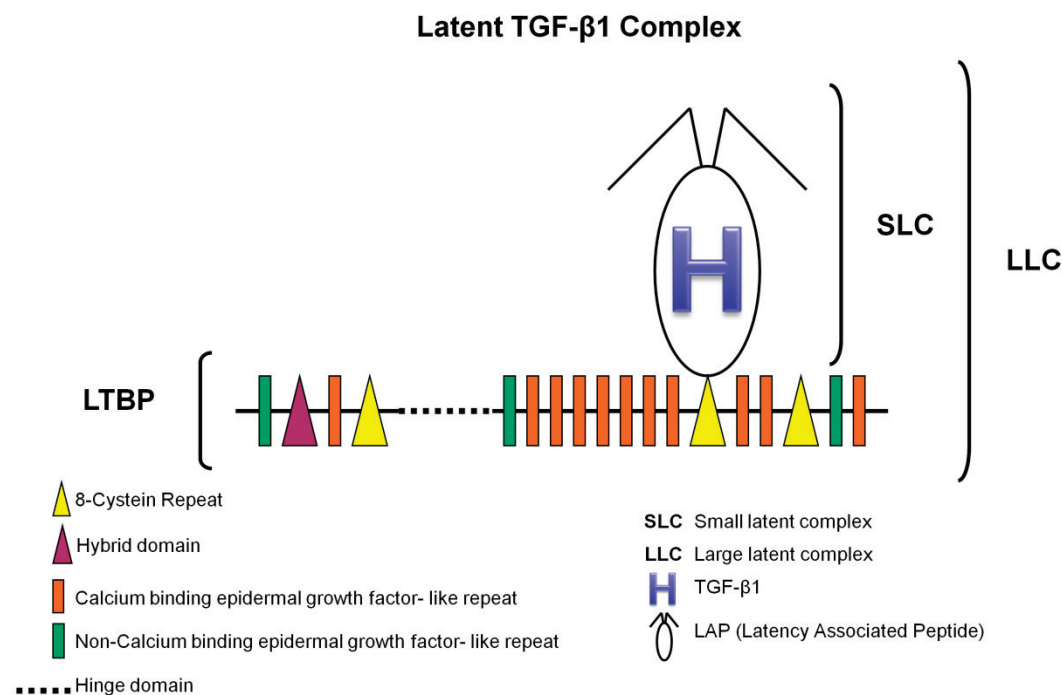


Figure 1. TGF- β 1 large latent complex. LLC is composed of (I) a mature TGF- β 1; (II) a latency associated peptide, which is a 75 kD homodimer with three side chains, two of which have the amino acid asparagine linked to mannose-6-phosphate oligosaccharides; and (III) a latent TGF- β binding protein of 125–160 kD, that contains 17 epidermal growth factor-like domains (14 of which are associated with calcium binding sequences) and four 70-amino-acid modules with eight cysteines each (adapted with permission from figure 1 in Rifkin DB. Latent transforming growth factor-beta [TGF-beta] binding proteins: Orchestrators of TGF-beta availability. *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 7409–7412 [48]).

3.2. TGF- β Receptors and Smads

TGF- β 1, as any other TGF- β family member, elicits its cellular effects by binding to different receptors. These are heteromeric complexes comprised of type I (activating-like kinase or ALK: ALK1, ALK2 and ALK5; ALK5 is also termed TGF- β R1) and type II (TGF- β R2) transmembrane serine/threonine kinase receptors. Type II receptors are constitutively active kinases capable of binding TGF- β 1 alone, while type I receptors can only bind the ligand in cooperation with type II receptors. There are also type III receptors or coreceptors (betaglycan, also termed TGF- β R3, and endoglin), that bind to TGF- β 1 and regulate this growth factor binding to its corresponding receptors, though they do not signal directly [51]. The type III receptors bind differing profiles of TGF- β family members. For instance, TGF- β R3, but not endoglin, can bind TGF- β 2, an important distinction as TGF- β 2 cannot otherwise bind to type II receptors. Thus, cells lacking TGF- β R3 are insensitive to TGF- β 2 [52].

Through intracellular mediators, known as Smads, the TGF- β 1 pathway can directly transduce extracellular cues from the cell-surface transmembrane receptors to the nucleus. This well conserved family (eight in mammals) can be divided into three functional classes: receptor-regulated Smads (R-Smads: Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 and Smad9, which is mostly known as Smad8), common-mediator Smads (Co-Smad: Smad4) and inhibitory Smads (I-Smad: Smad6 and Smad7) [21,22]. All R-Smads have a C-terminal SSXS motif, within which the last two serines are directly phosphorylated by the type I receptor, while I-Smads lack the C-terminal SXS phosphorylation motif and thus act as inducible inhibitors (negative regulators) of the pathway [21,26,53].

3.3. TGF- β 1 Signaling Pathways

Consistent with other TGF- β family members, TGF- β 1 uses several intracellular signaling pathways to regulate a wide array of cellular functions. In addition to the canonical pathway (the Smad-mediated signaling pathway, which is ubiquitous and functions universally in all cell types examined) there are noncanonical pathways (the Smad-independent or non-Smad signaling pathways) [21].

Mechanisms of Smad-mediated TGF- β 1 signaling are shown in Figure 2. Briefly, TGF- β 1 initiates its signaling by binding to high-affinity cell surface receptors, type I and type II receptors. TGF- β 1 binds to TGF- β R2, resulting in conformational changes that induces recruitment and complex formation with an appropriate type I receptor. Within the heterotetramer complex just formed, two type II receptors transphosphorylate two type I receptors in the glycine serine rich domain, activating their serine/threonine kinase activity [53,54]. In turn, the activated type I receptors mediate cellular effects through interaction and phosphorylation of R-Smads (ALK5 mediates the phosphorylation of R-Smad2/3, while ALK1/2 mediate the phosphorylation of R-Smad1/5/8) [26,53]. Upon phosphorylation, two activated R-Smads form a complex with Co-Smad, and this complex moves into the nucleus, where it combines with transcriptional activators and repressors, modulating target gene expression in a cell type-dependent manner [53,54]. The activation of R-Smads can be inhibited by I-Smads, which can compete for TGF-RI interaction, recruiting specific ubiquitin ligases or phosphatases to the activated receptor complex [26,53].

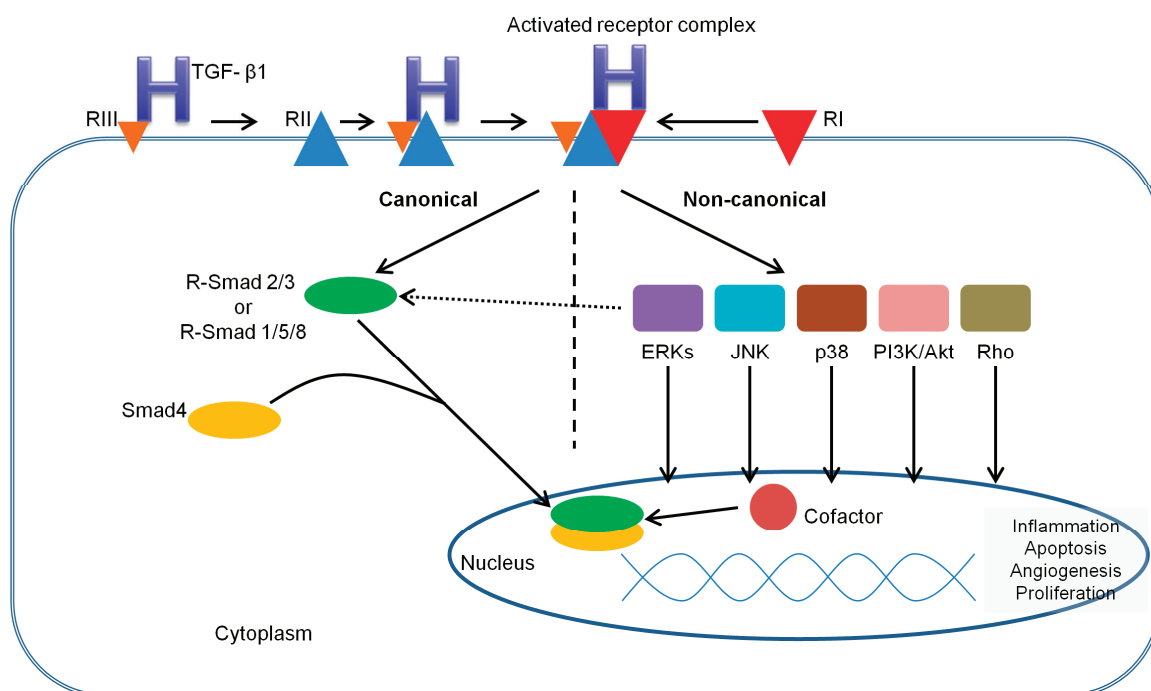


Figure 2. Smad-mediated TGF- β signaling system. Signal transduction by TGF- β 1 is mediated via specific heteromeric complexes of type I and type II receptors. In most cells TGF- β 1 interacts with TGF- β R2 (referred as RII) and ALK5 (referred as RI), but in EC it can also signal via ALK1 (also referred as RI). Coreceptors TGF- β R3 and endoglin (both referred as RIII) can facilitate TGF- β R2/ALK5 and TGF- β R2/ALK1 signaling. Activated receptor complex induces interaction and phosphorylation of R-Smad2/3 [26,53]. Upon phosphorylation, the two activated R-Smads form a heteromeric complex with Smad4. This complex is translocated into the nucleus, where it can interact with various transcription factors, coactivators or corepressors to modulate the expression of a multitude of genes, resulting in regulation of cellular responses (e.g., proliferation, differentiation, apoptosis).

A number of noncanonical signaling cascades that operate in a context-dependent manner and contribute to cell-specific biological responses have also been elucidated (Figure 2). Among those are, for example, the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways, including the extracellular signal-regulated kinases (Erks), c-Jun amino terminal kinase (JNK), p38 MAPK, as well as the I κ B kinase (IKK), phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) and Akt, and Rho family GTPases [21,55]. These non-Smad receptor-activated transducers mediate signaling responses, either as stand-alone pathways or in conjunction with Smads, and control Smad activities [55]. While many function in concert with Smads to promote TGF- β 1 responses (as in the case of Par6 phosphorylation and Smads during TGF- β 1 induced epithelial-to-mesenchymal transition), activation of MAPK can result in phosphorylation of the Smad linker which can then inhibit Smad function by preventing nuclear accumulation of Smads or by promoting Smad degradation [55]. The complexity of TGF- β signaling pathway cross talk with other pathways has become increasingly apparent, as well as how subtle perturbations can result in pathological dysregulation [55].

3.4. Regulation of TGF- β 1 Signaling

TGF- β 1 signaling is tightly regulated at different levels, from the availability of the ligand, to the amount of receptors on the cell surface and the downstream transcription factors that will ultimately dictate the outcome of TGF- β 1 signaling [56]. The regulation begins at the ligand level, during the proteolytic cleavage of LAP that will activate TGF- β 1. This cleavage is induced by acidic environmental conditions or executed by extracellular proteases, including thrombospondin-1, plasmin, cathepsin D, MMP2 and MMP9, and furin convertase [32,33,48,57]. In the absence of proteolytic cleavage, upon mechanical stretch, α V β 6 integrin can activate TGF- β 1, by binding to the RGD motif present in LAP and inducing the release of mature TGF- β 1 from its latent complex [57]. Decorin, a small leucine-rich proteoglycan, seems to enhance TGF- β bioactivity in VSMC without change in total TGF- β protein, suggesting a mechanism of regulation involving post-translational control of TGF- β activation, active TGF- β availability or enhanced receptor signaling complex formation [58].

TGF- β 1 signaling is also regulated at the level of its receptors, with FK506-binding protein 12 (FKBP12) that binds type I receptors (thus competing with type II receptors) to maintain them in an inactive conformation [59]. Once activated, TGF- β receptors are internalized through two major endocytic pathways, clathrin-mediated endocytosis and lipid raft/caveolae-mediated endocytosis. Internalization of TGF- β receptors through clathrin-dependent endocytosis enhances Smad-mediated TGF- β 1 signaling, whereas caveolin-mediated endocytosis promotes the ubiquitination and degradation of the receptors and thus signaling turnoff [60]. Several regulators of TGF- β receptor activity and stability have been identified, such as Casitas B-lineage lymphoma (c-Cbl) [61], the protein that interacts with C kinase 1 (PICK1) [62] or Dapper2 [63]. In addition, TGF- β coreceptors regulate the cell surface localization, internalization and signaling of their respective signaling receptors through interactions with the scaffolding proteins like GAIP-interacting protein C-terminus (GIPC) and β -arrestin2 [64].

At the Smad level, Smad2/3 binding to FYVE domain proteins (e.g., ZFYVE9, better known as hSARA) retains them in the cytoplasm awaiting activation by their respective type I receptor [65]. Interaction between phosphorylated Smads and Smad4 is also regulated, as ErbB2/Her2-interacting protein (Erbin) sequesters Smad2/3 in the cytoplasm away from Smad4, thus preventing TGF- β signaling [66]. In addition, several phosphatases, such as PPM1A or small C-terminal phosphatases, dephosphorylate Smads at this site either in the cytoplasm or in the nucleus to terminate Smad activity [67].

TGF- β 1 signaling regulation proceeds into the nucleus, where Smad complexes target specific promoters to regulate gene expression patterns. Given the low-affinity Smad/DNA binding, Smads are generally dependent on direct interaction with specific high-affinity DNA binding proteins (FOXH1 protein is just one of a growing list [60]) for recruitment to appropriate target genes [21]. Upon binding to DNA in partnership with specific transcription factors, Smads recruit coregulators (i.e.,

coactivators such as basic chromatin remodeling complexes and histone-modifying acetyltransferases or corepressors such as histone deacetylases) to promote or inhibit initiation of transcription [21,60].

Once the pathway is activated, a number of feedback mechanisms are turned on to regulate the duration and strength of the signal. For example, I-Smads, whose production is directly increased by TGF- β signaling, act as negative regulators of the pathway by forming stable complexes with activated type I receptors and thereby blocking the phosphorylation of R-Smads [68]. They also recruit WW-HECT-type E3 ubiquitin ligases (viz. Smad ubiquitin-related factor-1 or Smurf1, Smurf2, NEDD4-2 and WWP1) to type I receptors, which are essential for ubiquitination and degradation of the receptor complex, as well as the termination of the process [68]. Besides, TGF- β signaling pathways also stimulate the production of secreted proteins (e.g., protein acidic rich in cysteine or SPARC, cystatin C, fibulin-5) that function to both mediate and regulate signaling [69–71]. In the nucleus, Smad7 directly binds to DNA and represses TGF- β signaling by interfering with the functional R-Smad/Smad4-DNA complex [56].

Given the complexity of TGF- β 1 signaling and its regulation, it is not a surprise that aberrant expressions of the signaling components and signaling pathway dysregulation often result in human disease, as explained below.

4. The Role of TGF- β 1 Signaling Pathways in Vessel Wall Pathological Processes

4.1. TGF- β 1 and the Vascular Wall Shear Stress

Mechanical forces imposed by pulsatile flow of blood, which include frictional wall shear stress, circumferential distention and blood pressure, play an important role in maintaining vessel structure and function [72,73]. EC lining the vasculature are continuously exposed to shear stress, leading to reorganization of its cytoskeleton, to morphological alterations and to the production of a variety of substances that act on EC themselves and on surrounding cells (e.g., VSMC) [74]. Failure to adapt to shear stress results in endothelial damage, which may lead to generation of atherosclerotic plaques or abnormal vessel repair [73,75,76].

Several studies were able to link TGF- β 1 production and vascular remodeling induced by shear stress. It was demonstrated that human arterial and venous VSMC exposed to chronic cyclical mechanical strain responded, in a “dose-dependent” fashion, with an increase of TGF- β 1 mRNA expression and matrix accumulation [77]. According to the authors’ proposal, this would most likely represent the main biological mechanism whereby hypertension promotes cardiovascular matrix accumulation [77].

Other authors could confirm that low shear stress (which occurs preferentially at vessel branch points, bifurcations and regions of high curvature) was a pathological inducer for vascular remodeling by upregulated migration and proliferation of EC and VSMC [76]. An increased paracrine secretion of platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) and TGF- β 1 from EC induced by low shear stress was found, as well as the activation of ERK 1/2 and affected expressions of LOX and lamin A—processes that were suggested as having a possible role in the effects of PDGF-BB and/or TGF- β 1 on cellular migration and proliferation [76].

Furthermore, observations on vein graft remodeling have identified hemodynamic forces (wall shear and tensile stresses) as the primary stimuli that induce active reorganization of the graft wall, and a role for TGF- β 1 in this event. Evidence supporting the concept that increased wall stress after vein graft implantation induces the recruitment of adventitial fibroblasts, mediated by a connective tissue growth factor (CTGF, also known as CCN2) and TGF- β 1, and the conversion to a myofibroblast phenotype has been provided [78,79]. This adventitial adaptation, despite being important in the maintenance of wall stability (in response to an increased mechanical load), limits the early outward remodeling of the vein conduit and may have a detrimental effect on maintaining the long-term vein graft patency [78]. Recent findings (such as suppression of TIMP1, enhanced expression of TGF- β 1 and BMP-2 mRNA or upregulation of microRNA-138/200b/200c) were consistent with the previous

results and suggested a role of arterial-like wall strain in the activation of pro-pathological pathways, resulting in adventitial vessel growth, activation of vasa vasorum cells and upregulation of specific gene products associated to vascular remodeling and inflammation [75].

The potential role of TGF- β signaling in mediating the protective effects of physiological shear stress on EC was also studied. Interestingly, the results revealed that shear stress induced TGF- β 3 signaling and a subsequent activation of Kruppel-like factor 2 and nitric oxide (NO), indicating that TGF- β 3 (but not TGF- β 1) has a critical role in the maintenance of endothelial homeostasis in a hemodynamic environment [72].

4.2. TGF- β 1 and Vascular Wall Fibrosis

In physiological conditions, fibrosis is a process of normal wound healing and repair, activated in response to injury, to maintain the original tissue architecture and its functional integrity. It involves a complex multistage process with recruitment of inflammatory cells, release of fibrogenic cytokines and growth factors (such as TGF- β 1) and activation of collagen-producing cells [80]. However, prolonged chronic stimuli lead to a long term activation of myofibroblasts (a specialized type of fibroblasts that are normally activated during wound healing) [81], which in turn may result in excessive and abnormal deposition of ECM and fibrosis (Figure 3). If the build-up of ECM occurs in organs (e.g., lungs, liver, kidneys and skin) it can interfere with their function and, if it continues unabated, leads to organ failure [23].

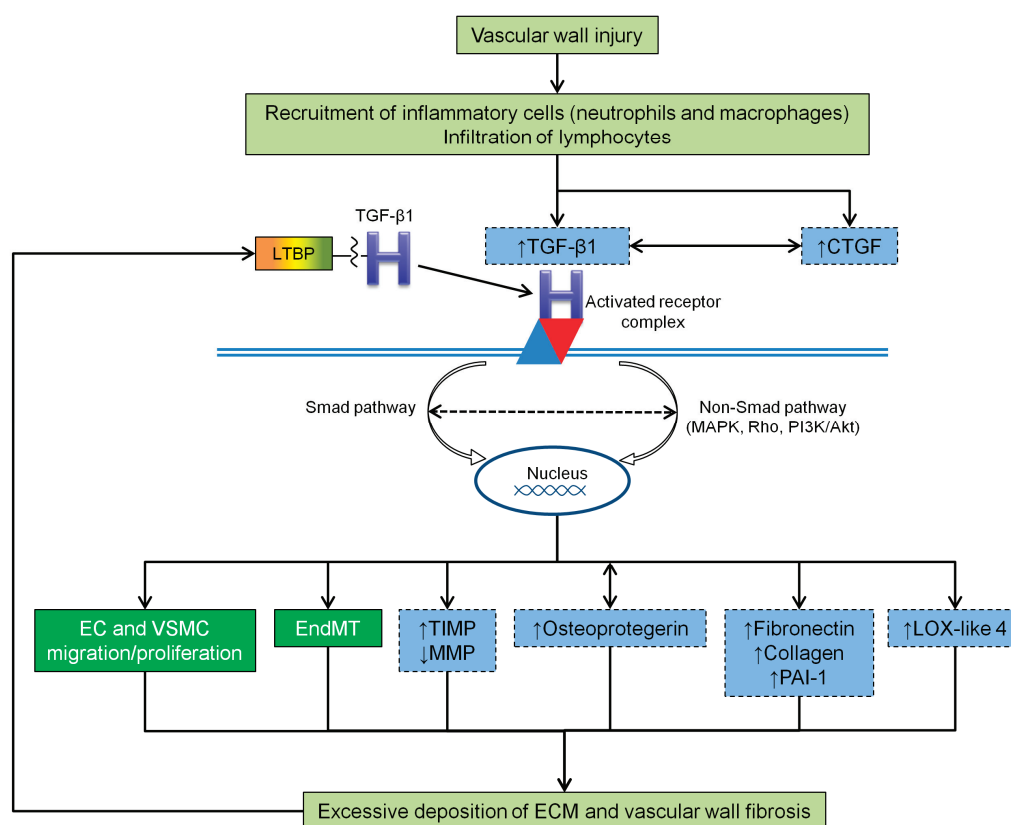


Figure 3. Mechanisms linking vascular wall injury, inflammation and vascular remodeling. TGF- β 1 (transforming growth factor-beta one), LTBP (latent TGF- β -binding protein), CTGF (connective tissue growth factor), EC (endothelial cells), VSMC (vascular smooth muscle cells), EndMT (endothelial-to-mesenchymal transition), TIMP (tissue inhibitors of metalloproteinases), MMP (metalloproteinases), PAI-1 (plasminogen activator inhibitor one), LOX-like 4 (lysyl oxidase-like four), ECM (extracellular matrix).

As mentioned before, TGF- β is a key regulator of ECM, thus its excessive signaling has long been implicated in the pathogenesis of vascular fibrosis and other fibrosis-related diseases. Moreover, it acts as a mediator of vascular fibrosis induced by several agents involved in vascular diseases (e.g., mechanical stress, angiotensin II, high glucose, advanced glycation products) [22,72,82,83]. The heat shock protein 70 (HSP70), whose primary function is to repair denatured proteins through folding/unfolding steps and thus achieve correct functional configuration, is another example of an agent believed to stimulate TGF β 1-induced ECM accumulation and to contribute to the inflammation and fibrosis present in fibrosis-related diseases [84].

Several genes encoding ECM proteins that are known to be important in driving fibrosis are directly regulated by TGF- β signaling, through Smads [85–87] as well as with the involvement of MAPKs, Rho family members and reactive oxygen species [22]. TGF- β 1, at low concentrations, increases the synthesis of ECM proteins, such as fibronectin, collagens and plasminogen activator inhibitor one (PAI-1) in VSMC, EC and fibroblasts [88–90] (Figure 3). The synthesis of fibronectin by VSMC, via the TGF- β 1/Smad3 signaling pathway, leads to the deposition of ECM in the neointima [91]. Other authors have shown that in a high-phosphate environment, the upregulation of fibronectin in cultured VSMC takes place via TGF- β 1 production [92]. The reduction of type I and III collagen secretion by VSMC is induced through TGF- β 1/Smad3 signaling pathway inhibition [93]. Expression levels of PAI-1, the major physiological regulator of the plasmin-based pericellular proteolytic cascade, are also linked to TGF β 1-induced neointimal expansion [89], although the actual role of PAI-1 in the development of a VSMC-rich neointima is likely to be complex [94,95].

A member of the lysyl oxidase family of matrix-remodeling enzymes, lysyl oxidase-like four (LOX-like 4), was also identified as a direct target of TGF- β 1 in EC and evidence that LOX-like 4 was extracellularly secreted and significantly contributed to ECM deposition was provided [96]. Such results suggest that TGF β 1-dependent expression of LOX-like 4 might have pathophysiological implications in vascular processes associated with matrix remodeling and fibrosis [96] (Figure 3).

It has been suggested that TGF- β 1 and CTGF synergize to promote chronic fibrosis [22] (Figure 3). CTGF is expressed predominantly in embryonic and adult vasculature, regulates various biological processes associated with fibrogenesis (including cellular adhesion, proliferation, differentiation, apoptosis, ECM production and angiogenesis) [97–99] and was found upregulated in a variety of fibrotic disorders [99]. The enhancement of TGF- β 1 activity via CTGF may occur through the following mechanisms: CTGF not only increases the affinity between TGF- β 1 and its receptors (by binding directly to the former), but also leads to Smad7 transcriptional suppression (via induction of the transcription factor TIEG) [22]. Evidence from in vitro studies indicated that CTGF might act as a downstream target of TGF- β 1, as treatment with exogenous TGF- β or exogenous CTGF significantly upregulated the TGF- β /CTGF pathway and increased the expression levels of ECM components [100]. In addition, studies with animal vein bypass grafts showed that an enhanced signaling via TGF- β /CTGF, coupled with the reduced MMP2 and MMP9 activity, promotes progressive ECM accumulation and neointimal fibrosis during late neointimal expansion in vein grafts [101].

Similarly, it seems that osteoprotegerin promotes fibrogenesis in VSMC via a TGF- β 1 autocrine loop [102] (Figure 3). This member of the tumor necrosis factor receptor family was found increased in VSMC of the vascular media in response to TGF- β 1, in a vicious cycle that results in the auto-induction of TGF- β 1, and was associated with upregulation of fibrogenesis [102].

The inhibition of ECM degradation (leading to excessive ECM accumulation) can also be reinforced by TGF- β 1 action on TIMP expression, which once stimulated helps to decrease collagenase production and activity [22,88] (Figure 3).

An additional contributor to fibrosis is the previously mentioned EndMT process (Figure 3), which is associated with increased expression of fibroblast-associated proteins [23], such as alpha smooth muscle actin (α -SMA) [78]. Indeed, TGF- β 1 can induce the transformation of fibroblasts into α -SMA expressing myofibroblasts and promote the secretion of ECM [78,79,93]. EndMT elaboration can further exacerbate fibrosis, as observed, for example, in renal fibrosis [103] or in arterial restenosis

following surgical trauma [104]. Studies addressing vein graft remodeling collected data that not only establishes EndMT as an important mechanism underlying neointimal formation in vein grafts, but also identifies a pivotal role for TGF β 1/Smad2/3-Slug signaling pathway in regulating vein graft EndMT [105]. Moreover, in the presence of elevated levels of Smad3, TGF- β 1 can promote a proliferative and/or migratory phenotype on VSMC, that can aggravate neointimal formation following vascular surgery [106,107]. More recently, it has been proposed that TGF- β 1/Smad signaling and MMP14 act to recruit mesenchymal stem cells which differentiate to VSMC and mesenchymal-like cells that participate in vascular repair and remodeling [108].

Intriguingly, these well-documented effects of TGF- β 1 activity on ECM remodeling (and its consequent mechanical property changes) seem to be part of a vicious cycle that drive cell fibrogenesis, since ECM straining and stiffening have an important impact on the activity and availability of this pro-fibrotic growth factor [50]. According to the author's hypothesis, during the gradual remodeling process, ECM will eventually reach an organization degree that lowers the threshold for TGF- β 1 activation, by increasing the mechanical resistance to cell pulling, and the available TGF- β 1 will then contribute to the activation of fibroblasts into contractile myofibroblasts, just when further remodeling of the strained and stiffened ECM requires stronger cell forces [50].

4.3. TGF- β 1 and Venous Wall Abnormal Morphology and Functioning

Healthy veins of the lower extremities are equipped with efficient walls, contractile VSMC and competent valves in order to withstand the high hydrostatic venous pressure in the lower limbs and allow unidirectional movement of deoxygenated blood toward the heart [17,18]. In contrast, varicose veins (a common clinical manifestation among patients with CVI [3]) appear to be dilated, elongated, tortuous and often show incompetent venous valves and a measurable venous reflux [8,18]. Moreover, structural and histological evidence suggest that varicose veins have both hypertrophic (with abnormal VSMC shape and orientation and ECM accumulation) and atrophic (with ECM degradation and an increase in inflammatory cell infiltration) regions [12,109,110] and no clear boundaries among vascular layers—irregular distribution of collagen bundles or thickened and fragmented elastic fibers may be found throughout the vein wall [111,112], making it difficult to distinguish between tunica intima, media and adventitia.

The primary reason for this extensive ECM remodeling and structural weakness of the vein wall has still not been clearly explained, but numerous factors, including TGF- β 1, seem to be implicated not only in the pathogenesis of varicose veins, but also in numerous complications associated with varicose veins (e.g., thrombophlebitis, lipodermatosclerosis, venous ulcers) [13,113,114].

Data regarding TGF- β 1 expression/activity in patients with CVI remains inconclusive (Table 1). Some studies reported unchanged TGF- β 1 levels in cell cultures from varicose veins [115] and comparable amounts of TGF- β 1 mRNA levels [113] or TGF- β 1 active form in normal and varicose veins [109]. By contrast, others demonstrated increased TGF- β 1 mRNA levels, protein expression, immunoreactivity and total content in the walls of varicose veins [109,116,117], or decreased protein expression of TGF- β 1 latent [19,113] and active [113] forms in varicose veins when age-related differences were controlled.

Table 1. Studies regarding TGF- β 1 expression and/or activity in veins.

Reference	Year	Specimen	TGF- β Expression and/or Activity in Veins
Badier-Commander C. [109]	2001	Varicose and non-varicose great saphenous vein segments	Increased total amount of TGF- β 1 in varicose segments, but identical amount of active TGF- β 1
Bujan J. [116]	2003	Varicose and non-varicose great saphenous vein segments	Increased TGF- β expression and decreased elastin synthesis in injured regions of varicose segments
Sansilvestri-Morel P. [115]	2005	Vascular smooth muscle cells (VSMC) from varicose and non-varicose great saphenous vein segments	Unchanged TGF- β 1 levels

Table 1. *Cont.*

Reference	Year	Specimen	TGF- β Expression and/or Activity in Veins
Jacob T. [117]	2005	Varicose and non-varicose great saphenous and tributaries vein segments	Increased TGF- β 1 expression in varicose segments
Pascual G. [19]	2007	Varicose and non-varicose great saphenous vein segments from older subjects	Reduced latent TGF- β 1 expression in varicose segments
Kowalewski R. [113]	2010	Varicose and non-varicose great saphenous vein segments	Unchanged TGF- β 1 mRNA levels and decreased latent and active TGF- β 1 expression in varicose segments
Serralheiro P. [118]	2017	Cultured healthy great saphenous veins	TGF- β 1 increased mRNA levels of MMP9, MMP12, TIMP1 and TIMP2

Furthermore, as tissue responsiveness to TGF- β 1 depends on several factors (e.g., TGF- β signaling components availability) rather than on its activation/availability alone, a few studies [113] evaluated mRNA expression and protein expression of TGF- β R2/3 and Smad2/3 in varicose vein walls and achieved, once more, opposite results. While Kowaleski et al. observed increased protein expression of TGF- β R2 and Smad2/3 in varicose veins (from patients assigned to class C2 of CEAP classification system), we found [119] decreased TGF- β R2/3 gene expression and TGF- β R2 immunoreactivity in varicose veins (from patients assigned to different classes: C2 to C6). Interestingly, based on a review of several studies reporting dermal fibroblast responsiveness to TGF- β 1 in venous ulcers [120], it was suggested that slower proliferative response of fibroblasts throughout CVeD progression was associated with a decrease in TGF- β R2 expression (and consequent abnormalities in the downstream signaling pathway, i.e., failure of ulcer fibroblasts to phosphorylate Smad2/3 and p42/44 MAPK [121]), ultimately leading to senescence and poor ulcer healing.

The conflicting results regarding TGF- β 1 (and its signaling components) expression/activity may be partially explained by important methodological differences: for example (no) use of effective control samples (i.e., control and varicose veins were harvested from patients with CVI), when some argue that CVeD is a generalized disorder in the venous system [18,112]; (no) control of individual differences between control and experimental groups, when there is evidence that aging induces dysregulation of TGF- β 1 [19]; (no) distinction between hypertrophic and atrophic varicose segments, when considerable heterogeneity regarding cellular and matrix components presence was already observed [12,109]; (no) separation of specimens based on anatomic harvest site, when vein source and location seem to be a factor of variability [122]. However, one can reasonably argue that these results also suggest that TGF- β 1 secretion, activation and/or cell signaling could be impaired and this may be a central pathological mechanism in CVeD.

As explained earlier, hemodynamic forces (wall shear and tensile stresses) and inflammation are among the potential factors that could modulate the expression/activity of TGF- β 1 in the vascular wall. An increase in venous hydrostatic pressure in the lower extremities (caused by certain genetic, environmental and behavioral risk factors) could lead to EC injury, increased permeability, activation of adhesion molecules and leukocyte infiltration—collectively these factors could contribute to vein wall inflammation [18,123,124] (Figure 4). In response to inflammation or injury, the active form of TGF- β 1 can be released by a variety of mechanisms, including enzymes such as proteases and glycosidases secreted by leukocytes and mast cells [4,19,33]. Enhanced infiltration of mast cells was noted in varicose vein walls (particularly from elderly subjects) [19,125], suggesting that degranulation of mast cells may release enzymes into the ECM (e.g., tryptase, hydrolases, oxidative enzymes, carboxypeptidases) and contribute to TGF- β 1 maturation or activation, as well as to venous wall diminished structural integrity [19] (e.g., mast cell tryptase catalyzes the degradation of different matrix components such as type IV collagen, elastin, fibronectin and extracellular proteoglycans [19,126]). Similarly, while studying the relationship between NO production (an important cellular-signaling molecule that regulates vascular tone and has diverse pathophysiologic functions such as inhibition of platelet adhesion/aggregation, mediation of the inflammatory cascade, among others) and TGF- β 1 expression

in varicose veins, it was found that TGF- β 1 overexpression was correlated with overproduction of inducible NO synthase and with monocyte/macrophage infiltration in both tortuous and nontortuous varicose veins [117]. It was then speculated that NO released by the upregulation of NO synthase enhances the production of TGF- β 1 in varicose veins, which in turn may be related to dysregulated cell cycle (e.g., decreased apoptosis) and to progressive hypertrophy of the vein wall [117] (Figure 4).

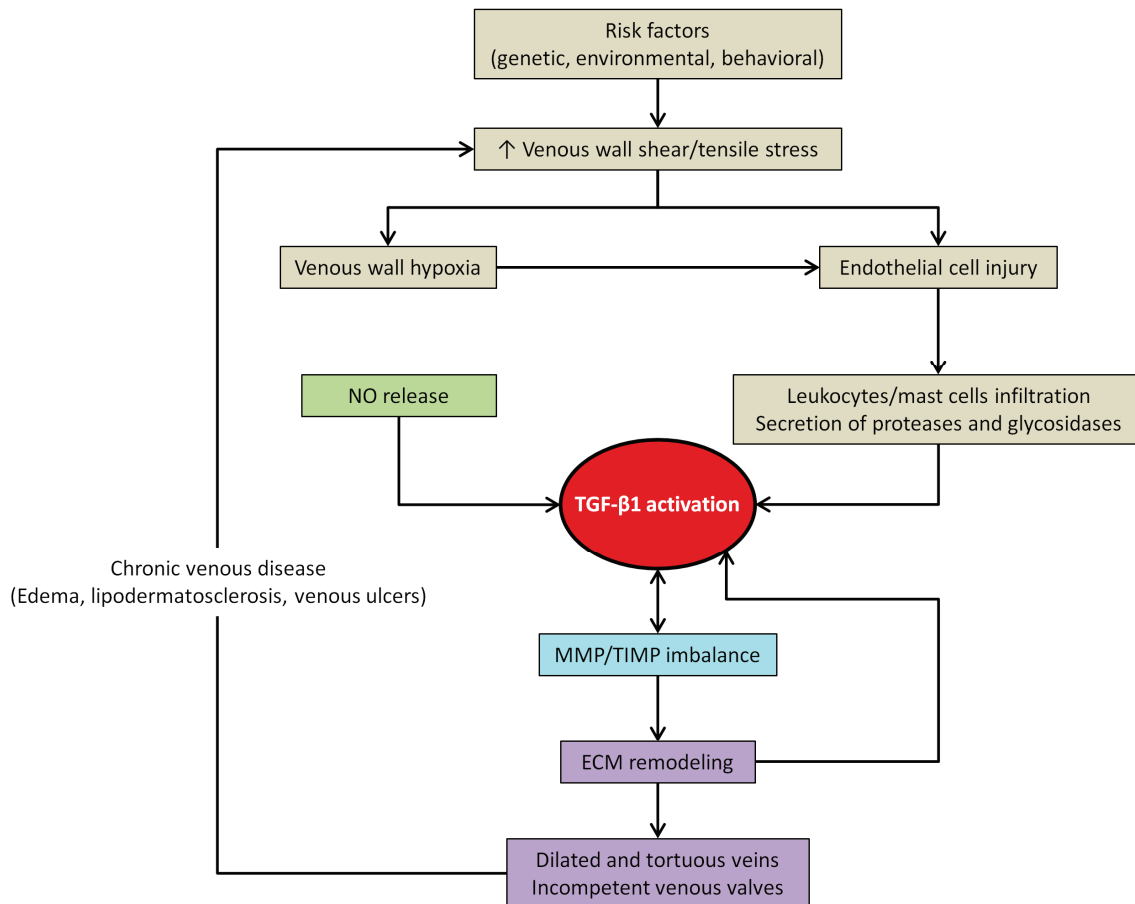


Figure 4. Schematic representation of chronic venous disease pathophysiology. NO (nitric oxide), TGF- β 1 (transforming growth factor-beta one), MMP (metalloproteinases), TIMP (tissue inhibitors of metalloproteinases), ECM (extracellular matrix).

Due to TGF- β 1 broad influence on ECM remodeling, vein wall imbalance of elastin and collagen content and the growth factor expression/activity (mostly in association with MMP/TIMP ratio changes) have also been an object of study. Depletion of vein elastic components is a common observation in the venous wall of elderly and CVI patients (particularly, during the disease later stages) [116,127] that was related to decreased elastin synthesis and increased elastase activity, which in turn could be a consequence of elastic tissue modulators (such as LTBP and TGF- β 1) attempt to stabilize elastin expression in regions of extensive injury [116]. In addition, some authors suggested that abnormalities in ECM structure leading to decreased elasticity and increased distensibility of the venous wall result from an imbalance between MMP (endopeptidases involved in the degradation of several ECM proteins) and TIMP (their endogenous inhibitors) [12,15,16,18,112,128], which are regulated at both transcriptional and post-transcriptional levels by various cytokines or growth factors, including TGF- β 1 [15,118] (Figure 4). In reverse, MMP upregulation may also promote growth factor release (by cleaving growth factor-binding proteins) and this may partly explain the VSMC hypertrophy observed in some parts of the hypertrophic regions of varicose veins [18].

Changes in TGF- β 1 expression/activity have also been associated with CVeD progression and with numerous CVI-related complications. Several studies concerning advanced forms of dermal pathology in CVI patients (i.e., dermal fibrosis and venous ulcers) have identified CVI dermal fibroblasts as an important target for leukocyte-derived TGF- β 1, and established a link between CVI progression and increased tissue levels of TGF- β 1, MMP2 activity and decreased TGF- β 1 induced mitogenic responses of fibroblasts [4,15,120,129,130]. Moreover, two other studies on CVI induced dermal changes suggested a connection between TGF- β 1 signaling and cellular senescence [130,131]. It was also proposed that a molecular mechanism in which the persistent venous hypertension (via pressure mediated mechanotransduction) could stimulate Ras production, which in turn would activate MAPK/Erks, and hence inhibit TGF- β 1 regulated matrix contraction (resulting in prolonged wound healing) [130]. Other authors, after observing differences in TGF- β 1 expression/activity (as well as in some of its signaling components, such as TGF- β R2 and Smad2/3) among control veins, varicose veins and varicose veins complicated by thrombophlebitis, proposed that thrombophlebitis accelerates TGF- β 1 activation and its signaling cascade in the varicose vein wall, which may have a role in the local inflammatory process [113].

5. Concluding Remarks

TGF- β 1 plays a key role in many biological and pathological processes, some of which have an impact on cardiovascular homeostasis. Considerable progress has been made over the past several years in the understanding of biomechanical and structural aspects of this growth factor, including its activation and intracellular signaling (canonical and noncanonical) pathways.

Despite its high prevalence and detrimental socioeconomic impact, CVeD is far from being completely understood due to major reasons: a multifactorial aetiology and a great difficulty to identify the primary stimulus and map the sequence of pathological events (by the time CVI symptoms present clinically, a vicious cycle of pathological events is already in motion). It has become widely accepted that vein wall changes and valvular dysfunction (appointed as primary events) are triggered by blood stasis and venous hypertension and are the result of sterile inflammatory reactions. All the main mechanisms postulated to contribute to the disease onset and development (i.e., shift in hemodynamic forces, wall inflammation, ECM degradation/deposition, venous tone alteration) seem to affect or be affected by TGF- β 1 expression and activity, which can be dysregulated.

While valuable research efforts have been made to understand the bimolecular mechanisms of severe complication of CVI, such as chronic venous leg ulcers, there is still much to understand about TGF- β 1 role in the pathophysiology of both early and late stages of CVeD. To date, there are only a few studies regarding TGF- β 1 expression/activity in CVeD patients, with a significant number of them reaching opposite results. The field requires not only more studies, but mostly methodological uniformity (e.g., use of effective control specimens, criteria for specimen anatomic harvest sites). Given the great number of components and regulation factors involved in TGF- β 1 signaling, future studies should focus on the expression/activity of molecules beyond TGF- β 1 itself (e.g., LTBP isoforms, TGF- β receptors, Smads, MAPKs, integrins). They should also take into account CVeD progression, as these molecules expression/activity may evolve throughout the disease stages. An example would be studying a few major TGF- β 1 signaling components in segments of healthy and varicose veins, grouped by different disease stages and specific anatomical regions, to better understand how differences, if any, in these molecules expression/activity may explain vein wall structural evolution throughout CVeD progression.

Among CVeD treatment modalities, the outlook for pharmacotherapy targeting the TGF- β 1 signaling pathway seems promising, yet challenging—current drugs targeting TGF- β 1 and its signaling components are not selective for pathological signaling pathways and require careful side effects monitoring [20]. It is paramount that the development of further studies should be able to dissect TGF- β 1 mechanisms of action as well as to identify new cell type regulators (that could be safely used for anti-TGF β signaling therapy), in order to improve effectiveness in CVeD prophylaxis and treatment.

Acknowledgments: This work was supported by the European Venous Forum pump priming grant and by a predoctoral fellowship from Fundação para a Ciência e Tecnologia (SFRH/SINTD/60063/2009). We would like to thank to Bhaskar Kumar, MBChB, MD, FRCS (Norfolk and Norwich University Hospital, UK) for the valuable suggestions throughout the writing of the manuscript.

Author Contributions: Pedro Serralheiro: Designed the project, reviewed the literature sources and drafted the manuscript. Andreia Soares: Reviewed the literature sources and drafted the manuscript. Carlos M. Costa Almeida: Designed the project and drafted the manuscript. Ignacio Verde: Designed the project and drafted the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Eklof, B.; Perrin, M.; Delis, K.T.; Rutherford, R.B.; Gloviczki, P.; American Venous Forum; European Venous Forum; International Union of Phlebology; American College of Phlebology; International Union of Angiology. Updated terminology of chronic venous disorders: The VEIN-TERM transatlantic interdisciplinary consensus document. *J. Vasc. Surg.* **2009**, *49*, 498–501. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Beebe-Dimmer, J.L.; Pfeifer, J.R.; Engle, J.S.; Schottenfeld, D. The epidemiology of chronic venous insufficiency and varicose veins. *Ann. Epidemiol.* **2005**, *15*, 175–184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Robertson, L.; Evans, C.; Fowkes, F.G. Epidemiology of chronic venous disease. *Phlebology* **2008**, *23*, 103–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Pappas, P.J.; You, R.; Rameshwar, P.; Gorti, R.; DeFouw, D.O.; Phillips, C.K.; Padberg, F.T., Jr.; Silva, M.B., Jr.; Simonian, G.T.; Hobson, R.W., II; et al. Dermal tissue fibrosis in patients with chronic venous insufficiency is associated with increased transforming growth factor- β 1 gene expression and protein production. *J. Vasc. Surg.* **1999**, *30*, 1129–1145. [[CrossRef](#)]
5. Eberhardt, R.T.; Raffetto, J.D. Chronic venous insufficiency. *Circulation* **2005**, *111*, 2398–2409. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Carpentier, P.H.; Maricq, H.R.; Biro, C.; Poncot-Makinen, C.O.; Franco, A. Prevalence, risk factors, and clinical patterns of chronic venous disorders of lower limbs: A population-based study in France. *J. Vasc. Surg.* **2004**, *40*, 650–659. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. McGuckin, M.; Waterman, R.; Brooks, J.; Cherry, G.; Porten, L.; Hurley, S.; Kerstein, M.D. Validation of venous leg ulcer guidelines in the United States and United Kingdom. *Am. J. Surg.* **2002**, *183*, 132–137. [[CrossRef](#)]
8. Bergan, J.; Pascarella, L. Venous Anatomy, Physiology, and Pathophysiology. In *The Vein Book*, 2nd ed.; Bergan, J.J., Bunke-Paquette, N., Eds.; Oxford University Press: New York, NY, USA, 2014; pp. 37–44.
9. Bergan, J. Molecular mechanisms in chronic venous insufficiency. *Ann. Vasc. Surg.* **2007**, *21*, 260–266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Pascarella, L.; Schmid-Schonbein, G.W.; Bergan, J. An animal model of venous hypertension: The role of inflammation in venous valve failure. *J. Vasc. Surg.* **2005**, *41*, 303–311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Takase, S.; Pascarella, L.; Lerond, L.; Bergan, J.J.; Schmid-Schonbein, G.W. Venous hypertension, inflammation and valve remodeling. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **2004**, *28*, 484–493. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Woodside, K.J.; Hu, M.; Burke, A.; Murakami, M.; Pounds, L.L.; Killewich, L.A.; Daller, J.A.; Hunter, G.C. Morphologic characteristics of varicose veins: Possible role of metalloproteinases. *J. Vasc. Surg.* **2003**, *38*, 162–169. [[CrossRef](#)]
13. Mannello, F.; Ligi, D.; Canale, M.; Raffetto, J.D. Omics profiles in chronic venous ulcer wound fluid: Innovative applications for translational medicine. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2014**, *14*, 737–762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Yasim, A.; Kilinc, M.; Aral, M.; Oksuz, H.; Kabalci, M.; Eroglu, E.; Imrek, S. Serum concentration of procoagulant, endothelial and oxidative stress markers in early primary varicose veins. *Phlebology* **2008**, *23*, 15–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Saito, S.; Trovato, M.J.; You, R.; Lal, B.K.; Fasehun, F.; Padberg, F.T., Jr.; Hobson, R.W., II; Duran, W.N.; Pappas, P.J. Role of matrix metalloproteinases 1, 2, and 9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in chronic venous insufficiency. *J. Vasc. Surg.* **2001**, *34*, 930–938. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

16. Aravind, B.; Saunders, B.; Navin, T.; Sandison, A.; Monaco, C.; Paleolog, E.M.; Davies, A.H. Inhibitory effect of TIMP influences the morphology of varicose veins. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **2010**, *40*, 754–765. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. MacColl, E.; Khalil, R.A. Matrix Metalloproteinases as Regulators of vein structure and function: Implications in chronic venous disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2015**, *355*, 410–428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Chen, Y.; Peng, W.; Raffetto, J.D.; Khalil, R.A. Matrix metalloproteinases in remodeling of lower extremity veins and chronic venous disease. *Prog. Mol. Boil. Transl. Sci.* **2017**, *147*, 267–299.
19. Pascual, G.; Mendieta, C.; Garcia-Honduvilla, N.; Corrales, C.; Bellon, J.M.; Bujan, J. TGF- β 1 upregulation in the aging varicose vein. *J. Vasc. Res.* **2007**, *44*, 192–201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Van Meeteren, L.A.; Goumans, M.J.; Dijke, P. TGF- β and Cardiovascular Disorders. In *TGF- β in Human Disease*, 1st ed.; Moustakas, A., Miyazawa, K., Eds.; Springer: Tokyo, Japan, 2013; pp. 297–322.
21. Weiss, A.; Attisano, L. The TGF β superfamily signaling pathway. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Boil.* **2013**, *2*, 47–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Ruiz-Ortega, M.; Rodriguez-Vita, J.; Sanchez-Lopez, E.; Carvajal, G.; Egido, J. TGF- β signaling in vascular fibrosis. *Cardiovasc. Res.* **2007**, *74*, 196–206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Gordon, K.J.; Blobel, G.C. Role of transforming growth factor- β superfamily signaling pathways in human disease. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1782*, 197–228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Annes, J.P.; Munger, J.S.; Rifkin, D.B. Making sense of latent TGF β activation. *J. Cell Sci.* **2003**, *116 Pt 2*, 217–224. [[CrossRef](#)]
25. Ding, R.; Darland, D.C.; Parmacek, M.S.; D’Amore, P.A. Endothelial-mesenchymal interactions in vitro reveal molecular mechanisms of smooth muscle/pericyte differentiation. *Stem Cells Dev.* **2004**, *13*, 509–520. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Goumans, M.J.; Liu, Z.; ten Dijke, P. TGF- β signaling in vascular biology and dysfunction. *Cell Res.* **2009**, *19*, 116–127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Ten Dijke, P.; Arthur, H.M. Extracellular control of TGF β signalling in vascular development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Boil.* **2007**, *8*, 857–869. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Van Meeteren, L.A.; Ten Dijke, P. Regulation of endothelial cell plasticity by TGF- β . *Cell Tissue Res.* **2012**, *347*, 177–186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Zeisberg, E.M.; Potenta, S.; Xie, L.; Zeisberg, M.; Kalluri, R. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 10123–10128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Kanzaki, T.; Tamura, K.; Takahashi, K.; Saito, Y.; Akikusa, B.; Oohashi, H.; Kasayuki, N.; Ueda, M.; Morisaki, N. In vivo effect of TGF- β 1. Enhanced intimal thickening by administration of TGF- β 1 in rabbit arteries injured with a balloon catheter. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **1995**, *15*, 1951–1957. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Michon, I.N.; Penning, L.C.; Molenaar, T.J.; van Berkel, T.J.; Biessen, E.A.; Kuiper, J. The effect of TGF- β receptor binding peptides on smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *293*, 1279–1286. [[CrossRef](#)]
32. Sato, Y.; Okada, F.; Abe, M.; Seguchi, T.; Kuwano, M.; Sato, S.; Furuya, A.; Hanai, N.; Tamaoki, T. The mechanism for the activation of latent TGF- β during co-culture of endothelial cells and smooth muscle cells: Cell-type specific targeting of latent TGF- β to smooth muscle cells. *J. Cell Biol.* **1993**, *123*, 1249–1254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Taipale, J.; Lohi, J.; Saarinen, J.; Kovanen, P.T.; Keski-Oja, J. Human mast cell chymase and leukocyte elastase release latent transforming growth factor- β 1 from the extracellular matrix of cultured human epithelial and endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 4689–4696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Graham, H.K.; Akhtar, R.; Kridiotis, C.; Derby, B.; Kundu, T.; Trafford, A.W.; Sherratt, M.J. Localised micro-mechanical stiffening in the ageing aorta. *Mech. Ageing Dev.* **2011**, *132*, 459–467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Lim, C.S.; Davies, A.H. Pathogenesis of primary varicose veins. *Br. J. Surg.* **2009**, *96*, 1231–1242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Rubtsov, Y.P.; Rudensky, A.Y. TGF β signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7*, 443–453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Lu, Q. Transforming growth factor- β 1 protects against pulmonary artery endothelial cell apoptosis via ALK5. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2008**, *295*, L123–L133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

38. Lu, Q.; Patel, B.; Harrington, E.O.; Rounds, S. Transforming growth factor-beta1 causes pulmonary microvascular endothelial cell apoptosis via ALK5. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2009**, *296*, L825–838. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Toma, I.; McCaffrey, T.A. Transforming growth factor-beta and atherosclerosis: Interwoven atherogenic and atheroprotective aspects. *Cell Tissue Res.* **2012**, *347*, 155–175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Mallat, Z.; Gojova, A.; Marchiol-Fournigault, C.; Esposito, B.; Kamate, C.; Merval, R.; Fradelizi, D.; Tedgui, A. Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ. Res.* **2001**, *89*, 930–934. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Neuzillet, C.; Tijeras-Raballand, A.; Cohen, R.; Cros, J.; Faivre, S.; Raymond, E.; de Gramont, A. Targeting the TGFbeta pathway for cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* **2015**, *147*, 22–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Serrati, S.; Margheri, F.; Pucci, M.; Cantelmo, A.R.; Cammarota, R.; Dotor, J.; Borrás-Cuesta, F.; Fibbi, G.; Albini, A.; del Rosso, M. TGFbeta1 antagonistic peptides inhibit TGFbeta1-dependent angiogenesis. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *77*, 813–825. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Pardali, E.; Ten Dijke, P. Transforming growth factor-beta signaling and tumor angiogenesis. *Front. Biosci.* **2009**, *14*, 4848–4861. [[CrossRef](#)]
44. Pepper, M.S. Transforming growth factor-beta: Vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev.* **1997**, *8*, 21–43. [[CrossRef](#)]
45. Herpin, A.; Lelong, C.; Favrel, P. Transforming growth factor-beta-related proteins: An ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. *Dev. Comp. Immunol.* **2004**, *28*, 461–485. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Flaumenhaft, R.; Abe, M.; Sato, Y.; Miyazono, K.; Harpel, J.; Heldin, C.H.; Rifkin, D.B. Role of the latent TGF-beta binding protein in the activation of latent TGF-beta by co-cultures of endothelial and smooth muscle cells. *J. Cell Biol.* **1993**, *120*, 995–1002. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Harrison, C.A.; Al-Musawi, S.L.; Walton, K.L. Prodomains regulate the synthesis, extracellular localisation and activity of TGF-beta superfamily ligands. *Growth Factors* **2011**, *29*, 174–186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Rifkin, D.B. Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: Orchestrators of TGF-beta availability. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 7409–7412. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Saharinen, J.; Keski-Oja, J. Specific sequence motif of 8-Cys repeats of TGF-beta binding proteins, LTBP, creates a hydrophobic interaction surface for binding of small latent TGF-beta. *Mol. Biol. Cell* **2000**, *11*, 2691–2704. [[CrossRef](#)]
50. Hinz, B. The extracellular matrix and transforming growth factor-beta1: Tale of a strained relationship. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **2015**, *47*, 54–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Kirkbride, K.C.; Ray, B.N.; Blobel, G.C. Cell-surface co-receptors: Emerging roles in signaling and human disease. *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30*, 611–621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Bernabeu, C.; Lopez-Novoa, J.M.; Quintanilla, M. The emerging role of TGF-beta superfamily coreceptors in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1792*, 954–973. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Pardali, E.; Goumans, M.J.; Ten Dijke, P. Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease. *Trends Cell Biol.* **2010**, *20*, 556–567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Tang, Y.; Yang, X.; Friesel, R.E.; Vary, C.P.; Liaw, L. Mechanisms of TGF-beta-induced differentiation in human vascular smooth muscle cells. *J. Vasc. Res.* **2011**, *48*, 485–494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Zhang, Y.E. Non-smad signaling pathways of the TGF-beta family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2017**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Zhao, B.; Chen, Y.G. Regulation of TGF-beta signal transduction. *Scientifica* **2014**, *2014*, 874065. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Shi, M.; Zhu, J.; Wang, R.; Chen, X.; Mi, L.; Walz, T.; Springer, T.A. Latent TGF-beta structure and activation. *Nature* **2011**, *474*, 343–349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Yan, J.; Stringer, S.E.; Hamilton, A.; Charlton-Menys, V.; Gotting, C.; Muller, B.; Aeschlimann, D.; Alexander, M.Y. Decorin GAG synthesis and TGF-beta signaling mediate Ox-LDL-induced mineralization of human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2011**, *31*, 608–615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Huse, M.; Chen, Y.G.; Massague, J.; Kuriyan, J. Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF beta receptor in complex with FKBP12. *Cell* **1999**, *96*, 425–436. [[CrossRef](#)]
60. Moustakas, A.; Heldin, C.H. The regulation of TGFbeta signal transduction. *Development* **2009**, *136*, 3699–3714. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

61. Zuo, W.; Huang, F.; Chiang, Y.J.; Li, M.; Du, J.; Ding, Y.; Zhang, T.; Lee, H.W.; Jeong, L.S.; Chen, Y.; et al. c-Cbl-mediated neddylation antagonizes ubiquitination and degradation of the TGF- β type II receptor. *Mol. Cell* **2013**, *49*, 499–510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Zhao, B.; Wang, Q.; Du, J.; Luo, S.; Xia, J.; Chen, Y.G. PICK1 promotes caveolin-dependent degradation of TGF- β type I receptor. *Cell Res.* **2012**, *22*, 1467–1478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Su, Y.; Zhang, L.; Gao, X.; Meng, F.; Wen, J.; Zhou, H.; Meng, A.; Chen, Y.G. The evolutionally conserved activity of Dapper2 in antagonizing TGF- β signaling. *FASEB J.* **2007**, *21*, 682–690. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Lee, N.Y.; Blobe, G.C. The interaction of endoglin with beta-arrestin2 regulates transforming growth factor- β -mediated ERK activation and migration in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 21507–21517. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Tang, W.B.; Ling, G.H.; Sun, L.; Liu, F.Y. Smad anchor for receptor activation (SARA) in TGF- β signaling. *Front. Biosci. (Elite Ed.)* **2010**, *2*, 857–860. [[PubMed](#)]
66. Dai, F.; Chang, C.; Lin, X.; Dai, P.; Mei, L.; Feng, X.H. Erbin inhibits transforming growth factor beta signaling through a novel Smad-interacting domain. *Mol. Cell. Biol.* **2007**, *27*, 6183–6194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Hill, C.S. Nucleocytoplasmic shuttling of Smad proteins. *Cell Res.* **2009**, *19*, 36–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Itoh, S.; Itoh, F. Inhibitory machinery for the TGF- β family signaling pathway. *Growth Factors* **2011**, *29*, 163–173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Albig, A.R.; Schieman, W.P. Fibulin-5 antagonizes vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling and angiogenic sprouting by endothelial cells. *DNA Cell Biol.* **2004**, *23*, 367–379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Schieman, B.J.; Neil, J.R.; Schieman, W.P. SPARC inhibits epithelial cell proliferation in part through stimulation of the transforming growth factor- β -signaling system. *Mol. Biol. Cell* **2003**, *14*, 3977–3988. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Sokol, J.P.; Neil, J.R.; Schieman, B.J.; Schieman, W.P. The use of cystatin C to inhibit epithelial-mesenchymal transition and morphological transformation stimulated by transforming growth factor- β . *Breast Cancer Res. BCR* **2005**, *7*, R844–R853. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Walshe, T.E.; dela Paz, N.G.; D’Amore, P.A. The role of shear-induced transforming growth factor- β signaling in the endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2013**, *33*, 2608–2617. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Wojciak-Stothard, B. Endothelial cell migration under flow. In *Cell Migration*, 2nd ed.; Wells, C.M., Parsons, M., Eds.; Humana Press: New York, NY, USA, 2011; Volume 769, pp. 137–147.
74. Birukov, K.G. Cyclic stretch, reactive oxygen species, and vascular remodeling. *Antioxid. Redox Signal.* **2009**, *11*, 1651–1667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Prandi, F.; Piola, M.; Soncini, M.; Colussi, C.; D’Alessandra, Y.; Penza, E.; Agrifoglio, M.; Vinci, M.C.; Polvani, G.; Gaetano, C.; et al. Adventitial vessel growth and progenitor cells activation in an ex vivo culture system mimicking human saphenous vein wall strain after coronary artery bypass grafting. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0117409. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Qi, Y.X.; Jiang, J.; Jiang, X.H.; Wang, X.D.; Ji, S.Y.; Han, Y.; Long, D.K.; Shen, B.R.; Yan, Z.Q.; Chien, S.; et al. PDGF-BB and TGF- β 1 on cross-talk between endothelial and smooth muscle cells in vascular remodeling induced by low shear stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 1908–1913. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. O’Callaghan, C.J.; Williams, B. Mechanical strain-induced extracellular matrix production by human vascular smooth muscle cells: Role of TGF- β (1). *Hypertension* **2000**, *36*, 319–324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Jiang, Z.; Yu, P.; Tao, M.; Fernandez, C.; Ifantides, C.; Moloye, O.; Schultz, G.S.; Ozaki, C.K.; Berceli, S.A. TGF- β - and CTGF-mediated fibroblast recruitment influences early outward vein graft remodeling. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2007**, *293*, H482–H488. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Zhou, H.Y.; Chen, W.D.; Zhu, D.L.; Wu, L.Y.; Zhang, J.; Han, W.Q.; Li, J.D.; Yan, C.; Gao, P.J. The PDE1A-PKC α signaling pathway is involved in the upregulation of alpha-smooth muscle actin by TGF- β 1 in adventitial fibroblasts. *J. Vasc. Res.* **2010**, *47*, 9–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Kisseleva, T.; Brenner, D.A. Mechanisms of fibrogenesis. *Exp. Biol. Med.* **2008**, *233*, 109–122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Krieg, T.; Abraham, D.; Lafyatis, R. Fibrosis in connective tissue disease: The role of the myofibroblast and fibroblast-epithelial cell interactions. *Arthrit. Res. Ther.* **2007**, *9* (Suppl. 2), S4. [[CrossRef](#)]
82. Wang, S.; Lincoln, T.M.; Murphy-Ullrich, J.E. Glucose downregulation of PKG-I protein mediates increased thrombospondin1-dependent TGF- β activity in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2010**, *298*, C1188–C1197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

83. Yu, C.H.; Suriguga, G.M.; Liu, W.J.; Cui, N.X.; Wang, Y.; Du, X.; Yi, Z.C. High glucose induced endothelial to mesenchymal transition in human umbilical vein endothelial cell. *Exp. Mol. Pathol.* **2017**, *102*, 377–383. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Gonzalez-Ramos, M.; Calleros, L.; Lopez-Ongil, S.; Raoch, V.; Griera, M.; Rodriguez-Puyol, M.; de Frutos, S.; Rodriguez-Puyol, D. HSP70 increases extracellular matrix production by human vascular smooth muscle through TGF- β 1 up-regulation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2013**, *45*, 232–242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Flanders, K.C. Smad3 as a mediator of the fibrotic response. *Int. J. Exp. Pathol.* **2004**, *85*, 47–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Ma, Y.; Li, W.; Yin, Y.; Li, W. AST IV inhibits H(2)O(2)-induced human umbilical vein endothelial cell apoptosis by suppressing Nox4 expression through the TGF- β 1/Smad2 pathway. *Int. J. Mol. Med.* **2015**, *35*, 1667–1674. [[PubMed](#)]
87. Wang, W.; Huang, X.R.; Canlas, E.; Oka, K.; Truong, L.D.; Deng, C.; Bhowmick, N.A.; Ju, W.; Bottinger, E.P.; Lan, H.Y. Essential role of Smad3 in angiotensin II-induced vascular fibrosis. *Circ. Res.* **2006**, *98*, 1032–1039. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Leask, A.; Abraham, D.J. TGF- β signaling and the fibrotic response. *FASEB J.* **2004**, *18*, 816–827. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Samarakoon, R.; Higgins, P.J. Integration of non-SMAD and SMAD signaling in TGF- β 1-induced plasminogen activator inhibitor type-1 gene expression in vascular smooth muscle cells. *Thromb. Haemost.* **2008**, *100*, 976–983. [[PubMed](#)]
90. Otsuka, G.; Agah, R.; Frutkin, A.D.; Wight, T.N.; Dichek, D.A. Transforming growth factor beta 1 induces neointima formation through plasminogen activator inhibitor-1-dependent pathways. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2006**, *26*, 737–743. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Ryer, E.J.; Hom, R.P.; Sakakibara, K.; Nakayama, K.I.; Nakayama, K.; Faries, P.L.; Liu, B.; Kent, K.C. PKC δ is necessary for Smad3 expression and transforming growth factor beta-induced fibronectin synthesis in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2006**, *26*, 780–786. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Wang, N.; Wang, X.; Sun, B.; Zeng, M.; Xing, C.; Zhao, X.; Yang, J. Role of TGF- β 1 in production of fibronectin in vascular smooth muscle cells cultured under high-phosphate conditions. *J. Nephrol.* **2013**, *26*, 213–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Lu, P.; Wang, S.; Cai, W.; Sheng, J. Role of TGF- β 1/Smad3 signaling pathway in secretion of type I and III collagen by vascular smooth muscle cells of rats undergoing balloon injury. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, *2012*, 965953. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Obi, A.T.; Diaz, J.A.; Ballard-Lipka, N.L.; Roelofs, K.J.; Farris, D.M.; Lawrence, D.A.; Wakefield, T.W.; Henke, P.K. Plasminogen activator-1 overexpression decreases experimental postthrombotic vein wall fibrosis by a non-vitronectin-dependent mechanism. *J. Thromb. Haemost. JTH* **2014**, *12*, 1353–1363. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Baldwin, J.E.; Sood, V.; Elfline, M.A.; Luke, C.E.; Dewyer, N.A.; Diaz, J.A.; Myers, D.D.; Wakefield, T.; Henke, P.K. The role of urokinase plasminogen activator and plasmin activator inhibitor-1 on vein wall remodeling in experimental deep vein thrombosis. *J. Vasc. Surg.* **2012**, *56*, 1089–1097. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Busnadiago, O.; Gonzalez-Santamaria, J.; Lagares, D.; Guinea-Viniegra, J.; Pichol-Thievend, C.; Muller, L.; Rodriguez-Pascual, F. LOXL4 is induced by transforming growth factor beta1 through Smad and JunB/Fra2 and contributes to vascular matrix remodeling. *Mol. Cell. Biol.* **2013**, *33*, 2388–2401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Rachfal, A.W.; Brigstock, D.R. Structural and functional properties of CCN proteins. *Vitam. Horm.* **2005**, *70*, 69–103. [[PubMed](#)]
98. Rodriguez-Vita, J.; Ruiz-Ortega, M.; Ruperez, M.; Esteban, V.; Sanchez-Lopez, E.; Plaza, J.J.; Egido, J. Endothelin-1, via ETA receptor and independently of transforming growth factor- β , increases the connective tissue growth factor in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **2005**, *97*, 125–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Shi-Wen, X.; Leask, A.; Abraham, D. Regulation and function of connective tissue growth factor/CCN2 in tissue repair, scarring and fibrosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2008**, *19*, 133–144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Ren, J.G.; Chen, G.; Zhu, J.Y.; Zhang, W.; Sun, Y.F.; Jia, J.; Zhang, J.; Zhao, Y.F. Downregulation of the transforming growth factor- β /connective tissue growth factor 2 signalling pathway in venous malformations: Its target potential for sclerotherapy. *Br. J. Dermatol.* **2014**, *171*, 242–251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

101. Jiang, Z.; Tao, M.; Omalley, K.A.; Wang, D.; Ozaki, C.K.; Berceci, S.A. Established neointimal hyperplasia in vein grafts expands via TGF- β -mediated progressive fibrosis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2009**, *297*, H1200–H1207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Toffoli, B.; Pickering, R.J.; Tsorotes, D.; Wang, B.; Bernardi, S.; Kantharidis, P.; Fabris, B.; Zauli, G.; Secchiero, P.; Thomas, M.C. Osteoprotegerin promotes vascular fibrosis via a TGF- β 1 autocrine loop. *Atherosclerosis* **2011**, *218*, 61–68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Lan, H.Y. Diverse roles of TGF- β /Smads in renal fibrosis and inflammation. *Int. J. Biol. Sci.* **2011**, *7*, 1056–1067. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Yao, E.H.; Fukuda, N.; Ueno, T.; Matsuda, H.; Nagase, H.; Matsumoto, Y.; Sugiyama, H.; Matsumoto, K. A pyrrole-imidazole polyamide targeting transforming growth factor- β 1 inhibits restenosis and preserves endothelialization in the injured artery. *Cardiovasc. Res.* **2009**, *81*, 797–804. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Cooley, B.C.; Nevado, J.; Mellad, J.; Yang, D.; Hilaire, C.S.; Negro, A.; Fang, F.; Chen, G.; San, H.; Walts, A.D.; et al. TGF- β signaling mediates endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) during vein graft remodeling. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6*, 227ra234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Suwanabol, P.A.; Seedial, S.M.; Zhang, F.; Shi, X.; Si, Y.; Liu, B.; Kent, K.C. TGF- β and Smad3 modulate PI3K/Akt signaling pathway in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2012**, *302*, H2211–H2219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Tsai, S.; Hollenbeck, S.T.; Ryer, E.J.; Edlin, R.; Yamanouchi, D.; Kundi, R.; Wang, C.; Liu, B.; Kent, K.C. TGF- β through Smad3 signaling stimulates vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2009**, *297*, H540–H549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Zhao, W.; Wang, C.; Liu, R.; Wei, C.; Duan, J.; Liu, K.; Li, S.; Zou, H.; Zhao, J.; Wang, L.; et al. Effect of TGF- β 1 on the migration and recruitment of mesenchymal stem cells after vascular balloon injury: Involvement of matrix metalloproteinase-14. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 21176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Badier-Commander, C.; Couvelard, A.; Henin, D.; Verbeuren, T.; Michel, J.B.; Jacob, M.P. Smooth muscle cell modulation and cytokine overproduction in varicose veins. An in situ study. *J. Pathol.* **2001**, *193*, 398–407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Michiels, C.; Arnould, T.; Thibaut-Vercriussen, R.; Bouaziz, N.; Janssens, D.; Remacle, J. Perfused human saphenous veins for the study of the origin of varicose veins: Role of the endothelium and of hypoxia. *Int. Angiol. J. Int. Union Angiol.* **1997**, *16*, 134–141.
111. Ghaderian, S.M.; Khodaii, Z. Tissue remodeling investigation in varicose veins. *Int. J. Mol. Cell. Med.* **2012**, *1*, 50–61.
112. Sansilvestri-Morel, P.; Fioretti, F.; Rupin, A.; Senni, K.; Fabiani, J.N.; Godeau, G.; Verbeuren, T.J. Comparison of extracellular matrix in skin and saphenous veins from patients with varicose veins: Does the skin reflect venous matrix changes? *Clin. Sci.* **2007**, *112*, 229–239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Kowalewski, R.; Malkowski, A.; Gacko, M.; Sobolewski, K. Influence of thrombophlebitis on TGF- β 1 and its signaling pathway in the vein wall. *Folia Histochem. Cytobiol. Pol. Acad. Sci. Pol. Histochem. Cytochem. Soc.* **2010**, *48*, 542–548.
114. Raffetto, J. Chronic Venous insufficiency: Molecular abnormalities and ulcer formation. In *The Vein Book*, 2nd ed.; Bergan, J.J., Bunke-Paquette, N., Eds.; Oxford University Press: New York, NY, USA, 2014; pp. 58–66.
115. Sansilvestri-Morel, P.; Rupin, A.; Jullien, N.D.; Lembrez, N.; Mestries-Dubois, P.; Fabiani, J.N.; Verbeuren, T.J. 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.* **2005**, *42*, 388–398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Bujan, J.; Gimeno, M.J.; Jimenez, J.A.; Kielty, C.M.; Mecham, R.P.; Bellon, J.M. Expression of elastic components in healthy and varicose veins. *World J. Surg.* **2003**, *27*, 901–905. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Jacob, T.; Hingorani, A.; Ascher, E. Overexpression of transforming growth factor- β 1 correlates with increased synthesis of nitric oxide synthase in varicose veins. *J. Vasc. Surg.* **2005**, *41*, 523–530. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Serralheiro, P.; Cairrao, E.; Maia, C.J.; Joao, M.; Costa Almeida, C.M.; Verde, I. Effect of TGF- β 1 on MMP/TIMP and TGF- β 1 receptors in great saphenous veins and its significance on chronic venous insufficiency. *Phlebology* **2017**, *32*, 334–341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Serralheiro, P.; Novais, A.; Cairrao, E.; Maia, C.J.; Costa Almeida, C.M.; Verde, I. Variability of MMP/TIMP and TGF- β 1 receptors throughout the clinical progression of chronic venous disease. To be submitted, 2017.

120. Pappas, P.J.; Lal, B.K.; Padberg, F.T., Jr.; Zickler, R.; Duran, W.N. Pathophysiology of chronic venous insufficiency. In *The Vein Book*, 2nd ed.; Bergan, J.J., Bunke-Paquette, N., Eds.; Oxford University Press: New York, NY, USA, 2014; pp. 67–78.
121. Kim, B.C.; Kim, H.T.; Park, S.H.; Cha, J.S.; Yufit, T.; Kim, S.J.; Falanga, V. Fibroblasts from chronic wounds show altered TGF- β -signaling and decreased TGF- β Type II receptor expression. *J. Cell. Physiol.* **2003**, *195*, 331–336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Gillespie, D.L.; Patel, A.; Fileta, B.; Chang, A.; Barnes, S.; Flagg, A.; Kidwell, M.; Villavicencio, J.L.; Rich, N.M. Varicose veins possess greater quantities of MMP-1 than normal veins and demonstrate regional variation in MMP-1 and MMP-13. *J. Surg. Res.* **2002**, *106*, 233–238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Raffetto, J.D.; Khalil, R.A. Mechanisms of varicose vein formation: Valve dysfunction and wall dilation. *Phlebology* **2008**, *23*, 85–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Schmid-Schonbein, G.W.; Takase, S.; Bergan, J.J. New advances in the understanding of the pathophysiology of chronic venous insufficiency. *Angiology* **2001**, *52* (Suppl. 1), S27–S34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Sayer, G.L.; Smith, P.D. Immunocytochemical characterisation of the inflammatory cell infiltrate of varicose veins. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **2004**, *28*, 479–483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Dai, H.; Korthuis, R.J. Mast Cell Proteases and Inflammation. *Drug Discov. Today Dis. Models* **2011**, *8*, 47–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Elsharawy, M.A.; Naim, M.M.; Abdelmaguid, E.M.; Al-Mulhim, A.A. Role of saphenous vein wall in the pathogenesis of primary varicose veins. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* **2007**, *6*, 219–224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Badier-Commander, C.; Verbeuren, T.; Lebard, C.; Michel, J.B.; Jacob, M.P. Increased TIMP/MMP ratio in varicose veins: A possible explanation for extracellular matrix accumulation. *J. Pathol.* **2000**, *192*, 105–112. [[CrossRef](#)]
129. Lal, B.K.; Saito, S.; Pappas, P.J.; Padberg, F.T., Jr.; Cerveira, J.J.; Hobson, R.W., 2nd; Duran, W.N. Altered proliferative responses of dermal fibroblasts to TGF- β 1 may contribute to chronic venous stasis ulcer. *J. Vasc. Surg.* **2003**, *37*, 1285–1293. [[CrossRef](#)]
130. Pappas, P.J.; Lal, B.K.; Ohara, N.; Saito, S.; Zapiach, L.; Duran, W.N. Regulation of matrix contraction in chronic venous disease. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **2009**, *38*, 518–529. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
131. Mikula-Pietrasik, J.; Uruski, P.; Aniukiewicz, K.; Sosinska, P.; Krasinski, Z.; Tykarski, A.; Ksiazek, K. Serum from varicose patients induces senescence-related dysfunction of vascular endothelium generating local and systemic proinflammatory conditions. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, 2069290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

5 Discussão

Nesta secção discutir-se-á de uma forma integrada os resultados da investigação levada a cabo. Esta discussão integrará não só os principais resultados obtidos nos dois estudos empíricos realizados e publicados (cf. secção 4), como também comentários que não tiveram lugar nas publicações já mencionadas. Note-se que a leitura desta secção não dispensa a consulta das discussões efetuadas no âmbito de cada um dos artigos.

A primeira questão a abordar está relacionada com amostra total de indivíduos participantes na investigação e às suas características. Recorde-se que participaram 44 sujeitos distribuídos por dois grupos (grupo controlo vs. grupo experimental ou com patologia venosa) não equivalentes relativamente a alguns fatores sociodemográficos e clínicos. No entanto, esta fonte de variabilidade foi controlada através do recurso a subamostras de participantes aleatoriamente escolhidos e cujos grupos não apresentavam diferenças estatisticamente significativas entre eles. Por outro lado, houve também características clínicas inerentes à patologia dos participantes (coronária vs. venosa) que não foi possível controlar ou que apresentaram uma prevalência pouco habitual. Assim, relativamente às características clínicas que podem predispor para a DVeC (obesidade, doença hemorroidária, veias varicosas durante a gravidez, historia familiar de DVeC e doença articular dos membros inferiores) a sua distribuição pelos grupos comportou-se de forma expectável, uma vez que os fatores em causa eram mais prevalentes no grupo com VGS insuficiente. Contudo, apesar da obesidade também ser considerada um fator predisponente para a doença coronária, esta não foi constatada nos indivíduos com VGS saudável. Este facto, muito provavelmente, pode estar relacionado com o acaso ou até com a decisão clínica decorrente da avaliação do risco pré-operatório dos doentes submetidos a *bypass* coronário. Os hábitos tabágicos, predisponentes quer da doença coronária[124] quer da venosa[125] (segundo alguns autores, embora não confirmado por outros[38]), foram tal como esperado prevalentes em ambos os grupos. Também a ausência de sintomas de DVeC (pernas pesadas, síndrome das pernas inquietas, dor, edema ou prurido e câimbras musculares nas pernas) foi ao encontro da expectativa relativamente aos indivíduos com VGS saudável, validando os resultados imagiológicos obtidos por ecodoppler venoso, segundo os quais nenhum desses indivíduos apresentava insuficiência venosa dos membros inferiores.

A segunda questão diz respeito à recolha de dados e à classificação, obtenção e análise de amostras de veia. Todo o processo de recolha de dados clínicos dos sujeitos, realização de ecodoppler venoso e colheita de amostras de veia, foi moroso e requereu bastante disciplina para que todo o protocolo previamente estabelecido fosse cumprido. Como as amostras de veia (saudáveis e insuficientes) tinham, necessariamente, de ser mantidas refrigeradas a 4°C por 24h e transferidas posteriormente para nitrogénio líquido (-80°C), foi necessário o

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

transporte diário de amostras para o CICS-UBI, quer do CHCB (situado a 500m de distância), quer do CHUC (situado a cerca de 200kms de distância). A recolha de amostras de veia saudável teve a particularidade de, para além do transporte diário de amostras de Coimbra para o CICS, exigir também o transporte diário do material para realização do ecodoppler pré-operatório para o CHUC. Acresce ainda o facto de, após constatação de que o género feminino estava pouco representado nos doentes sujeitos a *bypass* coronário, ter sido necessário estender o período de recolha de amostras inicialmente previsto, com o objetivo de aumentar (para um valor aceitável) a amostra de veias saudáveis provenientes de indivíduos deste género. Tal esforço foi realizado com a finalidade última de poder ser realizada a comparação entre os dois grupos de sujeitos (com e sem DVeC) com um viés menor sob o ponto de vista estatístico.

5.1 Discussão integrada dos principais resultados

Face às hipóteses de investigação apresentadas (cf. secção 2), pode considerar-se que a hipótese 1 foi parcialmente confirmada, na medida em que se demonstraram efetivamente diferenças estatisticamente significativas na expressão de MMP12, TIMP2, TIMP3, TIMP4 e TGFBR2 entre amostras de VGS saudáveis e insuficientes, colhidas na região talocrural. Apesar de não serem obtidos resultados estatisticamente significativos para algumas das moléculas estudadas, foi constatada uma diminuição generalizada de MMP, TIMP e TGFBR (à exceção da MMP9) em VGS insuficientes.

Quanto à hipótese 2, houve também uma confirmação parcial, visto que foram demonstradas diferenças estatisticamente significativas entre veias com DVeC em estágio inicial (CEAP2-3) e veias com DVeC em estágio avançado (CEAP4-6) na expressão de MMP9 na região safenofemoral de VGS, e de MMP2, TIMP3 e TGFBR3 em veias tributárias à VGS. Porém, não se obtiveram diferenças estatisticamente significativas em VGS colhidas na região talocrural.

A hipótese 3 foi confirmada, na medida em que foi demonstrada uma diminuição na imunomarcação de MMP2, TIMP2 e de TGFBR2 na parede de VGS insuficientes quando comparadas com VGS saudáveis, colhidas na região talocrural.

Relativamente à hipótese 4, pode considerar-se que foi marginalmente confirmada uma vez que a imunomarcação de MMP2 e de TGFBR2, numa aceção geral, não se revelou diferente entre veias com DVeC em estágio inicial (CEAP2-3) e estágio avançado (CEAP4-6). No entanto, com base nos dados descritivos, é possível perceber que o TIMP2 se mostrou genericamente diminuído nas túnica média e adventícia, e aumentado na túnica íntima de veias com DVeC em estágio avançado.

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador- β 1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

Por último, a hipótese 5 foi também parcialmente confirmada, visto que se obtiveram diferenças estatisticamente significativas na expressão de MMP9, MMP12, TIMP1 e TIMP2, entre VGS saudáveis tratadas e não tratadas com TGF- β 1. Apesar de não se constatarem diferenças estatisticamente significativas noutras MMP, TIMP e TGF β R, foi observada uma diminuição generalizada da sua expressão génica nas veias tratadas com TGF- β 1.

Como mencionado previamente, uma discussão mais detalhada pode ser encontrada em cada um dos artigos publicados, sendo nesta secção dada prioridade à discussão integrada dos resultados.

No presente trabalho foi demonstrada a inexistência de expressão de MMP8 e MMP13 em VGS. Curiosamente, outros autores demonstraram expressão de MMP13 nessas veias[79, 126], embora tenham usado métodos subjetivos de quantificação. Relativamente à MMP8, é conhecida a sua intervenção no processo cicatricial de úlceras venosas[127, 128], apesar disso ainda não foi demonstrada a sua expressão em VGS e de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, esta MMP não intervém no processo de remodelação venosa em VGS.

Neste trabalho também foi demonstrada uma diminuição da expressão de MMP12, TIMP2, TIMP3, TIMP4 e TGF β R2 em veias varicosas quando comparadas com veias saudáveis. Como referido anteriormente, existe uma grande disparidade de resultados publicados relativos à expressão de MMP em veias varicosas[55]. Estudos prévios mostraram que a expressão de MMP1[18, 79, 80], MMP2[18, 129], MMP9[80, 130], TIMP1[18, 82, 97, 131], TIMP2[97] e TIMP3[18] se encontrava mais elevada em veias varicosas. Por outro lado, uma diminuição da expressão de MMP1[81], MMP2[82, 97, 131] e TIMP2[18] também foi observada noutros estudos. Curiosamente também foram publicados estudos nos quais a expressão de MMP1[52, 129, 132], MMP2[52, 81, 132], MMP9[81, 129, 132], TIMP1[52, 81, 132] e TIMP2[52, 81, 82, 132] não se apresentou diferente entre veias varicosas e veias saudáveis. Estas divergências de resultados entre estudos podem ser atribuídas às diferenças na metodologia utilizada, tal como referido anteriormente (cf. secção 1.3.2.5).

Apesar de no presente trabalho não se terem demonstrado diferenças na expressão de MMP2 e MMP9 entre veias varicosas e saudáveis, o que está em concordância com estudos prévios[52, 81, 129, 132], outros autores demonstraram um aumento [18, 129, 130] ou mesmo uma diminuição de expressão[82, 131] destas MMP em veias varicosas. Este facto pode, tendo em conta os resultados obtidos, incluindo a existência de diferenças de expressão entre estádios de DVeC, dever-se ao tamanho da amostra. À luz dos resultados alcançados, é provável que se obtivessem diferenças estatisticamente significativas, pelo menos para a MMP2 e no sentido da diminuição de expressão em veias varicosas, com o incremento do tamanho da amostra.

Não existem muitos estudos sobre a análise da expressão de TGF β R em veias varicosas. Um único estudo demonstrou um aumento da expressão de TGF β R2 em veias varicosas[133]. Não

obstante, é importante referir que as amostras de veias varicosas obtidas para esse estudo incluíram unicamente veias trombosadas e com tromboflebite e que as amostras usadas como controlos negativos foram colhidas dos mesmos doentes, de uma região anatómica diferente e com VGS macroscopicamente saudável. Estas diferenças metodológicas poderão explicar os resultados díspares dos alcançados neste trabalho, nos quais se constatou uma diminuição da expressão de TGF β 2 em veias varicosas quando comparadas com veias saudáveis.

Os resultados imuno-histoquímicos obtidos demonstraram uma diminuição dos níveis de MMP2, TIMP2 e TGF β 2 em veias varicosas quando comparadas com veias saudáveis. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por outros autores[82, 126, 131]. No entanto, existe pelo menos um estudo publicado[18] cujos resultados, embora sejam concordantes com os obtidos para o TIMP2, contrariam os resultados deste trabalho para a deteção de MMP2. Neste estudo, a deteção de MMP2 parece estar ligeiramente aumentada em veias varicosas quando comparadas com VGS saudáveis. Apesar de terem sido publicados estudos que expõem a importância da túnica média, especificamente das CMLV[112] na patologia da DVeC, os resultados apresentados neste trabalho apontam para a importância da túnica íntima neste processo patológico, visto que existiu uma coerência marcada entre os resultados imuno-histoquímicos nessa túnica e os resultados dos estudos genéticos.

Na sua globalidade, os resultados obtidos parecem indicar que existe uma diferença de expressão e/ou atividade de MMP e TIMP em diferentes estádios da DVeC. É conhecida a diferença morfológica das veias ao longo da progressão da doença[80, 112, 134]. Os segmentos venosos tanto podem demonstrar sinais de atrofia da parede vascular (numa fase mais precoce), como segmentos hipertróficos/esclerosados (numa fase mais avançada). Sendo as MMP e os TIMP proteínas que participam no processo de remodelação da MEC, seria expectável que existisse uma diferença na sua expressão e/ou atividade em diferentes estádios da doença.

Por outro lado, mesmo que a expressão e a atividade de MMP se apresente aumentada, não significa que ocorra necessariamente um aumento do *turnover* da MEC. Na verdade, a atividade de MMP até pode estar aumentada e, ainda assim, ocorrer a hipertrofia da parede venosa. Este fenómeno pode ser devido ao facto da atividade dos TIMP se sobrepor à das MMP, originando um rácio MMP/TIMP negativo, que promove a redução do *turnover* da MEC e a hipertrofia do tecido vascular. Tal processo dificulta o estudo destas moléculas, na medida em que, em condições ideais, deveria ser analisada a totalidade das MMP e dos TIMP existentes no tecido em estudo. Recorde-se que as MMP possuem atividades proteolíticas diferentes em diferentes substratos, e se desconhece a eficácia de inibição de cada TIMP relativamente a cada MMP específica (tendo em consideração que esta eficácia poderá até ser modificada em situações patológicas e fisiológicas diferentes). Por essa razão, o processo para obter valores exatos do rácio MMP/TIMP na parede venosa torna-se extremamente complexo. Assim, com o objetivo de se alcançarem resultados mais verosímeis, a intervenção

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador- β 1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

destas moléculas na patologia venosa deve ser analisada tomando em consideração a região anatómica do tecido em estudo e o estágio clínico da doença, assim como utilizando o maior número possível de MMP e TIMP cuja intervenção no processo patológico é conhecida.

Logo, apesar de se ter demonstrado uma diminuição genérica de expressão quer de MMP quer de TIMP em veias insuficientes, quando comparadas com veias saudáveis, o balanço final na fase mais inicial da doença poderá ter privilegiado as MMP em relação aos TIMP (i.e., os TIMP poderão ter sofrido uma diminuição mais acentuada que as MMP). Sugere-se, então, que o efeito mais marcado das MMP possa causar uma degradação pronunciada da MEC e atrofia da parede vascular, originando dilatação sacular, com afastamento adicional das valvas valvulares venosas e, conseqüentemente, desenvolvimento da insuficiência venosa e a sua evolução no sentido da cronicidade.

Relativamente ao incremento marginal de MMP e TIMP genericamente observado em estádios avançados da doença (quando comparados com estádios mais iniciais), pode sugerir-se que, na fase avançada da doença, os efeitos dos TIMP deverão sobrepor-se aos efeitos das MMP. Este fenómeno poderá ocorrer depois de inúmeros ciclos de síntese e digestão de MEC, na tentativa de manter a homeostase da parede vascular e, muito provavelmente, para controlar o incremento da tensão hidrostática nas veias. Como resultado de todo este processo, ocorre a fibrose do tecido, tornando-se este mais rígido e menos complacente à hipertensão venosa, evitando a dilatação desmesurada da parede venosa e a sua eventual rutura.

Recorde-se que o estudo dos TGF β R demonstrou que a sua expressão se encontrava diminuída em veias insuficientes, quando comparadas com veias saudáveis. Tomando em consideração os resultados da adição de TGF- β 1 em VGS saudáveis, isto é, a elevação marginal da expressão de TGF β R (que, contudo, não atingiu expressão estatística, eventualmente devido ao tamanho da amostra), é possível sugerir que numa fase hiperaguda os TGF β R, em face de uma disponibilidade repentina de quantidades elevadas de TGF- β 1, tendem a aumentar a sua expressão. Isto pode ocorrer com o objetivo de transmitir mais eficazmente o sinal inflamatório na célula (aumentando também de forma hiperaguda a expressão de MMP e TIMP, como resultado do processo inflamatório). No entanto, após um período considerável de ação local do TGF- β 1, e talvez por um processo de retroação negativa, poderá ocorrer uma diminuição local dos TGF β R. Esta diminuição pode surgir com o objetivo de controlar um efeito crónico pró-inflamatório do TGF- β 1 e a eventual destruição do tecido venoso, face ao estímulo inflamatório constante. O fenómeno anterior é, provavelmente, o que explica a diminuição de expressão dos TGF β R em veias varicosas. Por outro lado, deve ser referido que esta teoria não explica a razão pela qual a expressão de MMP e TIMP aumenta ligeiramente em estádios avançados, quando comparados com estádios iniciais da DVeC (visto que a expressão de TGF β R2 diminui efetivamente). Para explicar este facto pode ser sugerido que, nos estádios mais avançados, as MMP e os TIMP na parede venosa podem ser influenciados por outro fator pró-inflamatório distinto do TGF- β 1 (p.e., interleucinas, VEGF ou fator de necrose

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador- β 1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

tumoral α). Nas fases mais agudas, o efeito do TGF- β 1 transmitido através dos seus recetores deve prevalecer (como foi, de resto, demonstrado na cultura de tecido de VGS).

Os diferentes resultados, obtidos em segmentos anatómicos de VGS específicos, podem ser explicados por dois factos distintos: (1) os segmentos desta veia são sujeitos a diferentes gradientes de pressão hidrostática, (2) a classificação clínica CEAP não é específica para cada segmento anatómico de veia. Por esta razão, poderão surgir diferentes padrões de alterações moleculares, com diferentes estádios de atrofia ou hipertrofia, no mesmo período temporal. Deste modo, por exemplo, um doente com doença classificada como CEAP 5/6 (com úlcera ativa ou cicatrizada) não tem necessariamente de apresentar alterações moleculares semelhantes na região safenofemoral e na talocrural. Mais a mais, é conhecida a possibilidade de existir insuficiência venosa distalmente a uma junção safenofemoral competente[135-137].

É importante referir também que, provavelmente, as MMP e os TIMP estudados não se comportam todos de modo semelhante ao longo da evolução da DVeC. A título de exemplo, veja-se a MMP9, cuja expressão foi aumentada após adição de TGF- β 1 em veias saudáveis, enquanto, nas fases avançadas da doença (por comparação com as fases iniciais), parece estar diminuída (ao contrário do que parece suceder com a MMP2 e o TIMP3). Estes dados parecem indicar que nem todas as MMP se comportam de igual forma e que algumas (p.e., a MMP9) podem exercer o seu efeito na parede venosa, primordialmente, numa fase mais inicial do processo patológico. Outra explicação para este facto pode residir na possibilidade de que o aumento de expressão de MMP9 possa ser quase exclusivamente originado pelo TGF- β 1. Como nas fases mais avançadas da doença venosa este parece diminuir a sua influência nas alterações moleculares do tecido, a expressão de MMP9 poderá, desta forma, apresentar-se diminuída. Por outro lado, as expressões de MMP2 e TIMP3, numa fase avançada da doença, poderão ser influenciadas por outros fatores de crescimento, por interleucinas ou mesmo pelo fator de necrose tumoral α , e, por essa razão, aumentarem a sua expressão. Assim, em trabalhos futuros, seria igualmente importante estudar estes fatores, para efetivamente perceber a sua influência na expressão de diferentes MMP e TIMP, em diferentes fases da DVeC. De modo semelhante, seria também pertinente estudar outros elementos intervenientes no processo de sinalização do TGF- β 1 para além dos seus recetores, nomeadamente isoformas de LTBP (*latent TGF- β binding protein*), Smads, MAPKs (*mitogen-activated protein kinase*) e integrinas. Estas moléculas poderão ter uma ação relevante no processo inflamatório e nas alterações moleculares ao nível da parede venosa. Considera-se, também, que seria importante aprofundar o conhecimento relativo a cada um dos efeitos do TGF- β 1, intervenientes na lesão de VGS, para além da ação nas MMP e nos TIMP, nomeadamente: a migração e proliferação de células endoteliais e CMLV; a transição endotelial-mesenquimatosa; a influência na expressão de osteoprotegerina, fibronectina, colagénio, inibidor do ativador de plasminogénio-1 e *lisil oxidase-like-4*. Sendo estas as vias conhecidas de lesão vascular mediadas pelo TGF- β 1, seria relevante compreender a sua ação

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

efetiva na patologia da DVeC. É importante assinalar ainda que os resultados obtidos dizem respeito à expressão génica de proteínas e à sua presença nas diferentes túnicas da parede venosa, e não à sua atividade. Deste modo, deve tomar-se em linha de conta que, apesar de existir uma probabilidade alta na relação entre expressão génica e a atividade proteica, isto pode não ocorrer efetivamente e, por isso, a atividade enzimática deveria também ser avaliada em estudos futuros.

Este é, por isso, um trabalho que não tem a pretensão de revelar, de modo definitivo, a totalidade do complexo processo patológico que ocorre em veias insuficientes. Apesar do que ele vem acrescentar (novos dados relativamente a segmentos específicos da fisiopatologia venosa), reconhece-se que existe ainda muito por estudar. Um dos pontos essenciais neste tema, e que fica ainda por desvendar, é o que despoleta o processo fisiopatológico inicial na DVeC e que define o grupo de indivíduos que desenvolverão a doença.

Naturalmente este trabalho apresenta limitações. A primeira diz respeito à seleção de algumas MMP, no universo de 23 MMP conhecidas, que foi possível submeter a estudo. Foram escolhidas as MMP que, de acordo com os estudos previamente publicados, apresentariam uma maior probabilidade de serem implicadas na fisiopatologia da doença venosa[55]. A amostra de indivíduos estudados é também reduzida, como resultado de todo um processo bastante moroso e complexo de colheita das amostras de veia. No entanto, é importante referir que, apesar do número reduzido de participantes neste estudo, este trabalho inclui um dos maiores números de amostras de VGS sujeitas a estudo genético publicados até hoje.

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

6 Conclusões e implicações na investigação e na prática clínica

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram pela primeira vez que o TGF- β 1 influencia de facto a expressão de MMP, TIMP e TGFBR em VGS. Revelaram também que existe uma diminuição de expressão de MMP12, de TIMP2, de TIMP3, de TIMP4, e de TGFBR2 em veias varicosas quando comparadas com veias saudáveis e que, quando submetidas a comparação diferentes fases da doença, existe uma diminuição da expressão de MMP9 e de TGFBR3, assim como um aumento da expressão de MMP2 e de TIMP3 em estádios avançados. Tendo em conta a diminuição da expressão de TGFBR em veias varicosas, assim como nas fases avançadas da doença, poderá ser sugerido que ocorre uma diminuição da participação do TGF- β 1 no equilíbrio de MMP/TIMP, nas fases mais avançadas da DVeC. Também se constatou que os resultados imuno-histoquímicos da túnica íntima das veias foram coerentes com os resultados genéticos, realçando a sua importância no processo patológico da doença. Apesar de tudo, foram identificadas diferenças a nível molecular entre diferentes regiões anatómicas de veia, o que demonstra a influência do processo metodológico na incoerência de resultados observados em estudos publicados anteriormente e adiciona dados importantes para a definição metodológica de estudos futuros.

As implicações dos resultados obtidos neste trabalho, assim como de qualquer outro que apresente novos dados relativos às modificações moleculares que ocorrem na DVeC, são de extrema importância. Atualmente, os tratamentos disponíveis para esta patologia são utilizados unicamente com o intuito de controlar os sintomas e retardar a progressão da doença, ao invés de tratar efetivamente o seu processo molecular. Os doentes tratados com os métodos atuais, se viverem tempo suficiente, desenvolverão muito provavelmente a doença com as suas possíveis complicações, uma vez que o processo patológico não é verdadeiramente extinto, mas sim “paliado”. Por esta razão, conhecer mais aprofundadamente o processo fisiopatológico da doença reveste-se de grande importância, para que no futuro seja possível desenvolver tratamentos farmacológicos ou mesmo genéticos que permitam a cura ao invés da “paliação”.

A ideia de uma terapia direcionada à sinalização de TGF- β 1 é bastante interessante, na medida em que permitiria controlar localmente o processo inflamatório que gera as alterações moleculares na parede venosa e que dá origem a um círculo vicioso, que confere o carácter crónico da doença. Existem alguns estudos com diferentes moléculas, incluindo anticorpos monoclonais e inibidores de recetores desenvolvidos para inibir o efeito tumorigénico do TGF- β 1, assim como o seu efeito pró-fibrótico no microambiente tumoral, que apresentaram resultados animadores[138]. De igual forma, existem dados publicados que

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador- β 1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

sugerem que anti-inflamatórios não esteroides inibidores da ciclooxigenase podem influenciar a via TGF- β 1/SMADs e conseqüentemente a inflamação e fibrose local[139]. Contudo, o desenvolvimento destas terapias é muito complexo, uma vez que estas terão de ser super seletivas para determinadas vias de sinalização, assim como para atuar de modo local e nunca sistémico, dado que o TGF- β 1 participa em inúmeros processos fisiológicos no organismo.

O futuro também parece ser promissor no desenvolvimento de terapias que atuem diretamente na estabilização das MMP/TIMP na parede da veia, controlando eficazmente o processo molecular patológico. No entanto, como estas proteínas são de extrema importância no processo cicatricial de lesões vasculares, o desenvolvimento de terapias direcionadas torna-se, mais uma vez, um processo de grande complexidade.

Não obstante, considera-se que um maior esclarecimento do papel fisiopatológico do TGF- β 1, das MMP e dos TIMP na DVeC poderá contribuir para o desenvolvimento futuro de terapias direcionadas, que permitam efetivamente curar a doença, ou mesmo atuar de forma profilática em doentes de risco.

7 Referências

1. Al Shammeri O, AlHamdan N, Al-Hothaly B, Midhet F, Hussain M, Al-Mohaimeed A: **Chronic Venous Insufficiency: prevalence and effect of compression stockings.** *International journal of health sciences* 2014, **8**(3):231-236.
2. Vuylsteke ME, Thomis S, Guillaume G, Modliszewski ML, Weides N, Staelens I: **Epidemiological study on chronic venous disease in Belgium and Luxembourg: prevalence, risk factors, and symptomatology.** *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 2015, **49**(4):432-439.
3. Zolotukhin IA, Seliverstov EI, Shevtsov YN, Avakiants IP, Nikishkov AS, Tatarintsev AM, Kirienko AI: **Prevalence and Risk Factors for Chronic Venous Disease in the General Russian Population.** *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 2017, **54**(6):752-758.
4. Eberhardt RT, Raffetto JD: **Chronic venous insufficiency.** *Circulation* 2014, **130**(4):333-346.
5. Criqui MH, Jamosmos M, Fronck A, Denenberg JO, Langer RD, Bergan J, Golomb BA: **Chronic venous disease in an ethnically diverse population: the San Diego Population Study.** *American journal of epidemiology* 2003, **158**(5):448-456.
6. Sam RC, Hobbs SD, Darvall KA, Rehman A, Adam DJ, Silverman SH, Bradbury AW: **Chronic venous disease in a cohort of healthy UK Asian men.** *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 2007, **34**(1):92-96.
7. Brown KR, Rossi PJ: **Superficial venous disease.** *The Surgical clinics of North America* 2013, **93**(4):963-982, ix-x.
8. Albuquerque de Matos A, Mansilha A, Serra Brandão E, Cássio I, Barbosa J, França J: **Recomendações no diagnóstico e tratamento da doença venosa crónica.** In: Edited by Vascular SPdAeC: Sociedade Portuguesa de Angiologia e Cirurgia Vascular; 2011: 1-60.
9. Bergan J, Pascarella L: **Venous Anatomy, Physiology, and Pathophysiology.** In: *The Vein Book*. 2 edn. Edited by Bergan; JJ, Bunke-Paquette; N. New York, NY, USA: Oxford University Press; 2014: 37-44.

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

10. Abdulla R, Blew GA, Holterman MJ: **Cardiovascular embryology**. *Pediatric cardiology* 2004, **25**(3):191-200.
11. Ribatti D, Nico B, Crivellato E: **The development of the vascular system: a historical overview**. *Methods in molecular biology* 2015, **1214**:1-14.
12. Carmeliet P: **Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis**. *Nature medicine* 2000, **6**(4):389-395.
13. Mozes G, Gloviczki P: **Venous embryology and anatomy**. In: *The Vein Book*. 2 edn. Edited by Bunke. JJBaN. New York, USA: Oxford University Press; 2014: 17-26.
14. Segiet OA, Brzozowa-Zasada M, Piecuch A, Dudek D, Reichman-Warmusz E, Wojnicz R: **Biomolecular mechanisms in varicose veins development**. *Annals of vascular surgery* 2015, **29**(2):377-384.
15. Servier: **Cardiovascular-system - veins medical art**. In. Edited by Art SM: Servier 2018.
16. Pappas PJ, Lal BK, Padberg FT, Jr., Zickler R, Duran WN: **Pathophysiology of Chronic Venous Insufficiency**. In: *The Vein Book*. 2 edn. Edited by Bergan; JJ, Bunke-Paquette; N. New York, NY, USA: Oxford University Press; 2014: 67-78.
17. MacColl E, Khalil RA: **Matrix Metalloproteinases as Regulators of Vein Structure and Function: Implications in Chronic Venous Disease**. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2015, **355**(3):410-428.
18. Sansilvestri-Morel P, Fioretti F, Rupin A, Senni K, Fabiani JN, Godeau G, Verbeuren TJ: **Comparison of extracellular matrix in skin and saphenous veins from patients with varicose veins: does the skin reflect venous matrix changes?** *Clinical science* 2007, **112**(4):229-239.
19. **Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice**, 41st edn. UK: Elsevier; 2016.
20. Costa Almeida CM: **Fisiopatologia da insuficiência venosa crónica**. In: *Varizes dos Membros Inferiores - Aspetos Práticos*. 1 edn. Edited by Alves CP, Almeida CC, Balhau AP: Sociedade Portuguesa de Cirurgia - Capítulo de Ciurgia Vascular; 2018: 59-66.
21. Wittens C, Davies AH, Baekgaard N, Broholm R, Cavezzi A, Chastanet S, de Wolf M, Eggen C, Giannoukas A, Gohel M *et al*: **Editor's Choice - Management of Chronic Venous Disease: Clinical Practice Guidelines of the European Society for Vascular**

- Surgery (ESVS).** *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 2015, **49**(6):678-737.
22. Costa Almeida CM: **Epidemiologia e fisiopatologia da úlcera venosa.** In: *Úlcera venosa - Diagnóstico e Tratamento.* 1 edn. Edited by Almeida CMC, Balhau AP, Alves CP: Sociedade Portuguesa de Cirurgia - Capítulo de Cirurgia Vasculuar; 2016: 33-42.
 23. Chen Y, Peng W, Raffetto JD, Khalil RA: **Matrix Metalloproteinases in Remodeling of Lower Extremity Veins and Chronic Venous Disease.** *Progress in molecular biology and translational science* 2017, **147**:267-299.
 24. Eklof B, Perrin M, Delis KT, Rutherford RB, Gloviczki P, American Venous F, European Venous F, International Union of P, American College of P, International Union of A: **Updated terminology of chronic venous disorders: the VEIN-TERM transatlantic interdisciplinary consensus document.** *Journal of vascular surgery* 2009, **49**(2):498-501.
 25. Eklof B, Rutherford RB, Bergan JJ, Carpentier PH, Gloviczki P, Kistner RL, Meissner MH, Moneta GL, Myers K, Padberg FT *et al*: **Revision of the CEAP classification for chronic venous disorders: consensus statement.** *Journal of vascular surgery* 2004, **40**(6):1248-1252.
 26. Carpentier PH, Maricq HR, Biro C, Poncot-Makinen CO, Franco A: **Prevalence, risk factors, and clinical patterns of chronic venous disorders of lower limbs: a population-based study in France.** *Journal of vascular surgery* 2004, **40**(4):650-659.
 27. Hirai M, Naiki K, Nakayama R: **Prevalence and risk factors of varicose veins in Japanese women.** *Angiology* 1990, **41**(3):228-232.
 28. Lee AJ, Robertson LA, Boghossian SM, Allan PL, Ruckley CV, Fowkes FG, Evans CJ: **Progression of varicose veins and chronic venous insufficiency in the general population in the Edinburgh Vein Study.** *Journal of vascular surgery Venous and lymphatic disorders* 2015, **3**(1):18-26.
 29. Robertson L, Evans C, Fowkes FG: **Epidemiology of chronic venous disease.** *Phlebology* 2008, **23**(3):103-111.
 30. Bradbury A, Evans C, Allan P, Lee A, Ruckley CV, Fowkes FG: **What are the symptoms of varicose veins? Edinburgh vein study cross sectional population survey.** *Bmj* 1999, **318**(7180):353-356.

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

31. Brand FN, Dannenberg AL, Abbott RD, Kannel WB: **The epidemiology of varicose veins: the Framingham Study.** *American journal of preventive medicine* 1988, 4(2):96-101.
32. Raffetto JD, Khalil RA: **Mechanisms of varicose vein formation: valve dysfunction and wall dilation.** *Phlebology* 2008, 23(2):85-98.
33. Naoum JJ, Hunter GC, Woodside KJ, Chen C: **Current advances in the pathogenesis of varicose veins.** *The Journal of surgical research* 2007, 141(2):311-316.
34. Laurikka JO, Sisto T, Tarkka MR, Auvinen O, Hakama M: **Risk indicators for varicose veins in forty- to sixty-year-olds in the Tampere varicose vein study.** *World journal of surgery* 2002, 26(6):648-651.
35. Rabe E, Guex JJ, Puskas A, Scuderi A, Fernandez Quesada F, Coordinators VCP: **Epidemiology of chronic venous disorders in geographically diverse populations: results from the Vein Consult Program.** *International angiology : a journal of the International Union of Angiology* 2012, 31(2):105-115.
36. Nicolaides A, Kakkos S, Eklof B, Perrin M, Nelzen O, Neglen P, Partsch H, Rybak Z: **Management of chronic venous disorders of the lower limbs - guidelines according to scientific evidence.** *International angiology : a journal of the International Union of Angiology* 2014, 33(2):87-208.
37. Mannello F, Ligi D, Canale M, Raffetto JD: **Omics profiles in chronic venous ulcer wound fluid: innovative applications for translational medicine.** *Expert review of molecular diagnostics* 2014, 14(6):737-762.
38. Ramelet AA, Perrin M, Kern P, Bounameaux H: **Phlebology - The Guide**, 5th edn: Elsevier - Masson; 2008.
39. Raffetto JD: **Pathophysiology of Chronic Venous Disease and Venous Ulcers.** *The Surgical clinics of North America* 2018, 98(2):337-347.
40. Schmid-Schonbein GW, Takase S, Bergan JJ: **New advances in the understanding of the pathophysiology of chronic venous insufficiency.** *Angiology* 2001, 52 Suppl 1:S27-34.
41. Gujja K, Wiley J, Krishnan P: **Chronic Venous Insufficiency.** *Interventional cardiology clinics* 2014, 3(4):593-605.

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador- β 1 na doença venosa crônica dos membros inferiores

42. Jurukova Z, Milenkov C: **Ultrastructural evidence for collagen degradation in the walls of varicose veins.** *Experimental and molecular pathology* 1982, **37**(1):37-47.
43. Gandhi RH, Irizarry E, Nackman GB, Halpern VJ, Mulcare RJ, Tilson MD: **Analysis of the connective tissue matrix and proteolytic activity of primary varicose veins.** *Journal of vascular surgery* 1993, **18**(5):814-820.
44. Bergan J: **Molecular mechanisms in chronic venous insufficiency.** *Annals of vascular surgery* 2007, **21**(3):260-266.
45. Ligi D, Mosti G, Croce L, Raffetto JD, Mannello F: **Chronic venous disease - Part II: Proteolytic biomarkers in wound healing.** *Biochimica et biophysica acta* 2016, **1862**(10):1900-1908.
46. Ligi D, Mosti G, Croce L, Raffetto JD, Mannello F: **Chronic venous disease - Part I: Inflammatory biomarkers in wound healing.** *Biochimica et biophysica acta* 2016, **1862**(10):1964-1974.
47. Pappas PJ, You R, Rameshwar P, Gorti R, DeFouw DO, Phillips CK, Padberg FT, Jr., Silva MB, Jr., Simonian GT, Hobson RW, 2nd *et al*: **Dermal tissue fibrosis in patients with chronic venous insufficiency is associated with increased transforming growth factor- β 1 gene expression and protein production.** *Journal of vascular surgery* 1999, **30**(6):1129-1145.
48. Pascarella L, Schmid-Schonbein GW, Bergan J: **An animal model of venous hypertension: the role of inflammation in venous valve failure.** *Journal of vascular surgery* 2005, **41**(2):303-311.
49. Saharay M, Shields DA, Georgiannos SN, Porter JB, Scurr JH, Coleridge Smith PD: **Endothelial activation in patients with chronic venous disease.** *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 1998, **15**(4):342-349.
50. Saito S, Trovato MJ, You R, Lal BK, Fasehun F, Padberg FT, Jr., Hobson RW, 2nd, Duran WN, Pappas PJ: **Role of matrix metalloproteinases 1, 2, and 9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in chronic venous insufficiency.** *Journal of vascular surgery* 2001, **34**(5):930-938.
51. Takase S, Pascarella L, Lerond L, Bergan JJ, Schmid-Schonbein GW: **Venous hypertension, inflammation and valve remodeling.** *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 2004, **28**(5):484-493.

52. Woodside KJ, Hu M, Burke A, Murakami M, Pounds LL, Killewich LA, Daller JA, Hunter GC: **Morphologic characteristics of varicose veins: possible role of metalloproteinases.** *Journal of vascular surgery* 2003, **38**(1):162-169.
53. Ligi D, Croce L, Mannello F: **Chronic Venous Disorders: The Dangerous, the Good, and the Diverse.** *Int J Mol Sci* 2018, **19**(9).
54. Cui N, Hu M, Khalil RA: **Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases.** *Progress in molecular biology and translational science* 2017, **147**:1-73.
55. Lim CS, Davies AH: **Pathogenesis of primary varicose veins.** *The British journal of surgery* 2009, **96**(11):1231-1242.
56. Raffetto JD, Mannello F: **Pathophysiology of chronic venous disease.** *International angiology : a journal of the International Union of Angiology* 2014, **33**(3):212-221.
57. Nissinen L, Kahari VM: **Matrix metalloproteinases in inflammation.** *Biochimica et biophysica acta* 2014, **1840**(8):2571-2580.
58. Chen Q, Jin M, Yang F, Zhu J, Xiao Q, Zhang L: **Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling.** *Mediators of inflammation* 2013, **2013**:928315.
59. Fingleton B: **Matrix metalloproteinases as regulators of inflammatory processes.** *Biochimica et biophysica acta* 2017, **1864**(11 Pt A):2036-2042.
60. Van Doren SR: **Matrix metalloproteinase interactions with collagen and elastin.** *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 2015, **44-46**:224-231.
61. Knauper V, Will H, Lopez-Otin C, Smith B, Atkinson SJ, Stanton H, Hembry RM, Murphy G: **Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme.** *The Journal of biological chemistry* 1996, **271**(29):17124-17131.
62. English WR, Holtz B, Vogt G, Knauper V, Murphy G: **Characterization of the role of the "MT-loop": an eight-amino acid insertion specific to progelatinase A (MMP2) activating membrane-type matrix metalloproteinases.** *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**(45):42018-42026.

63. Arpino V, Brock M, Gill SE: **The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis.** *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 2015, **44-46**:247-254.
64. Khokha R, Murthy A, Weiss A: **Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity.** *Nature reviews Immunology* 2013, **13**(9):649-665.
65. Batra J, Robinson J, Soares AS, Fields AP, Radisky DC, Radisky ES: **Matrix metalloproteinase-10 (MMP-10) interaction with tissue inhibitors of metalloproteinases TIMP-1 and TIMP-2: binding studies and crystal structure.** *The Journal of biological chemistry* 2012, **287**(19):15935-15946.
66. Baker AH, Edwards DR, Murphy G: **Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities.** *Journal of cell science* 2002, **115**(Pt 19):3719-3727.
67. Meng Q, Malinovskii V, Huang W, Hu Y, Chung L, Nagase H, Bode W, Maskos K, Brew K: **Residue 2 of TIMP-1 is a major determinant of affinity and specificity for matrix metalloproteinases but effects of substitutions do not correlate with those of the corresponding P1' residue of substrate.** *The Journal of biological chemistry* 1999, **274**(15):10184-10189.
68. Morgunova E, Tuuttila A, Bergmann U, Tryggvason K: **Structural insight into the complex formation of latent matrix metalloproteinase 2 with tissue inhibitor of metalloproteinase 2.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(11):7414-7419.
69. Kolkenbrock H, Orgel D, Hecker-Kia A, Noack W, Ulbrich N: **The complex between a tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-2) and 72-kDa progelatinase is a metalloproteinase inhibitor.** *European journal of biochemistry* 1991, **198**(3):775-781.
70. Fridman R, Bird RE, Hoyhtya M, Oelkuct M, Komarek D, Liang CM, Berman ML, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG, Fuerst TR: **Expression of human recombinant 72 kDa gelatinase and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2): characterization of complex and free enzyme.** *Biochem J* 1993, **289** (Pt 2):411-416.
71. Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI: **Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease.** *The Journal of biological chemistry* 1995, **270**(10):5331-5338.
72. Sato H, Takino T, Kinoshita T, Imai K, Okada Y, Stetler Stevenson WG, Seiki M: **Cell surface binding and activation of gelatinase A induced by expression of**

- membrane-type-1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *FEBS letters* 1996, 385(3):238-240.**
73. Butler GS, Butler MJ, Atkinson SJ, Will H, Tamura T, Schade van Westrum S, Crabbe T, Clements J, d'Ortho MP, Murphy G: **The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase "receptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study. *The Journal of biological chemistry* 1998, 273(2):871-880.**
74. Zucker S, Drews M, Conner C, Foda HD, DeClerck YA, Langley KE, Bahou WF, Docherty AJ, Cao J: **Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) binds to the catalytic domain of the cell surface receptor, membrane type 1-matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP). *The Journal of biological chemistry* 1998, 273(2):1216-1222.**
75. Suenaga N, Mori H, Itoh Y, Seiki M: **CD44 binding through the hemopexin-like domain is critical for its shedding by membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Oncogene* 2005, 24(5):859-868.**
76. Patterson ML, Atkinson SJ, Knauper V, Murphy G: **Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. *FEBS letters* 2001, 503(2-3):158-162.**
77. Freitas-Rodriguez S, Folgueras AR, Lopez-Otin C: **The role of matrix metalloproteinases in aging: Tissue remodeling and beyond. *Biochimica et biophysica acta* 2017, 1864(11 Pt A):2015-2025.**
78. Dzieciuchowicz L, Espinosa G, Paramo JA: **Increased Levels of Metalloproteinase 10 and Hemostatic Markers in Patients With Noncomplicated Primary Varicose Veins. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 2015, 21(7):684-687.**
79. Gillespie DL, Patel A, Fileta B, Chang A, Barnes S, Flagg A, Kidwell M, Villavicencio JL, Rich NM: **Varicose veins possess greater quantities of MMP-1 than normal veins and demonstrate regional variation in MMP-1 and MMP-13. *The Journal of surgical research* 2002, 106(2):233-238.**
80. Naik B, Kumar M, Khanna AK, Suman PK: **Clinico-histopathological study of varicose vein and role of matrix metalloproteinases-1, matrix metalloproteinases-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in varicose vein formation. *Indian journal of pathology & microbiology* 2016, 59(1):25-30.**

81. Ishikawa Y, Asuwa N, Ishii T, Ito K, Akasaka Y, Masuda T, Zhang L, Kiguchi H: **Collagen alteration in vascular remodeling by hemodynamic factors.** *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 2000, **437**(2):138-148.
82. Parra JR, Cambria RA, Hower CD, Dassow MS, Freischlag JA, Seabrook GR, Towne JB: **Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is increased in the saphenofemoral junction of patients with varices in the leg.** *Journal of vascular surgery* 1998, **28**(4):669-675.
83. Asanuma K, Magid R, Johnson C, Nerem RM, Galis ZS: **Uniaxial strain upregulates matrix-degrading enzymes produced by human vascular smooth muscle cells.** *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2003, **284**(5):H1778-1784.
84. Alsaigh T, Pocock ES, Bergan JJ, Schmid-Schonbein GW: **Acute venous occlusion enhances matrix metalloprotease activity: Implications on endothelial dysfunction.** *Microvascular research* 2011, **81**(1):108-116.
85. Raffetto JD, Qiao X, Koledova VV, Khalil RA: **Prolonged increases in vein wall tension increase matrix metalloproteinases and decrease constriction in rat vena cava: Potential implications in varicose veins.** *Journal of vascular surgery* 2008, **48**(2):447-456.
86. Castro-Ferreira R, Cardoso R, Leite-Moreira A, Mansilha A: **The Role of Endothelial Dysfunction and Inflammation in Chronic Venous Disease.** *Annals of vascular surgery* 2018, **46**:380-393.
87. Grudzinska E, Czuba ZP: **Immunological aspects of chronic venous disease pathogenesis.** *Central-European journal of immunology* 2014, **39**(4):525-531.
88. Ono T, Bergan JJ, Schmid-Schonbein GW, Takase S: **Monocyte infiltration into venous valves.** *Journal of vascular surgery* 1998, **27**(1):158-166.
89. Sayer GL, Smith PD: **Immunocytochemical characterisation of the inflammatory cell infiltrate of varicose veins.** *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 2004, **28**(5):479-483.
90. Sato H, Kita M, Seiki M: **v-Src activates the expression of 92-kDa type IV collagenase gene through the AP-1 site and the GT box homologous to retinoblastoma control elements. A mechanism regulating gene expression**

- independent of that by inflammatory cytokines.** *The Journal of biological chemistry* 1993, **268**(31):23460-23468.
91. Reddy VS, Prabhu SD, Mummidi S, Valente AJ, Venkatesan B, Shanmugam P, Delafontaine P, Chandrasekar B: **Interleukin-18 induces EMMPRIN expression in primary cardiomyocytes via JNK/Sp1 signaling and MMP-9 in part via EMMPRIN and through AP-1 and NF-kappaB activation.** *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2010, **299**(4):H1242-1254.
92. Arbiser JL, Petros J, Klafter R, Govindajaran B, McLaughlin ER, Brown LF, Cohen C, Moses M, Kilroy S, Arnold RS *et al*: **Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(2):715-720.
93. Zubkova ES, Men'shikov MY, Plekhanova OS, Beloglazova IB, Ratner EI, Parfenova EV: **Urokinase stimulates production of matrix metalloproteinase-9 in fibroblasts with involvement of reactive oxygen species.** *Bulletin of experimental biology and medicine* 2014, **157**(1):18-21.
94. Kucukguven A, Khalil RA: **Matrix metalloproteinases as potential targets in the venous dilation associated with varicose veins.** *Current drug targets* 2013, **14**(3):287-324.
95. Kim CH, Cho YS, Chun YS, Park JW, Kim MS: **Early expression of myocardial HIF-1alpha in response to mechanical stresses: regulation by stretch-activated channels and the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway.** *Circ Res* 2002, **90**(2):E25-33.
96. Misra S, Fu AA, Rajan DK, Juncos LA, McKusick MA, Bjarnason H, Mukhopadhyay D: **Expression of hypoxia inducible factor-1 alpha, macrophage migration inhibition factor, matrix metalloproteinase-2 and -9, and their inhibitors in hemodialysis grafts and arteriovenous fistulas.** *Journal of vascular and interventional radiology : JVIR* 2008, **19**(2 Pt 1):252-259.
97. Gomez I, Benyahia C, Louedec L, Leseche G, Jacob MP, Longrois D, Norel X: **Decreased PGE(2) content reduces MMP-1 activity and consequently increases collagen density in human varicose vein.** *PLoS One* 2014, **9**(2):e88021.
98. Venturi M, Bonavina L, Annoni F, Colombo L, Butera C, Peracchia A, Mussini E: **Biochemical assay of collagen and elastin in the normal and varicose vein wall.** *The Journal of surgical research* 1996, **60**(1):245-248.

99. Kirsch D, Dienes HP, Kuchle R, Duschner H, Wahl W, Bottger T, Junginger T: **Changes in the extracellular matrix of the vein wall--the cause of primary varicosis?** *VASA Zeitschrift fur Gefasskrankheiten* 2000, **29**(3):173-177.
100. Sansilvestri-Morel P, Rupin A, Badier-Commander C, Kern P, Fabiani JN, Verbeuren TJ, Vanhoutte PM: **Imbalance in the synthesis of collagen type I and collagen type III in smooth muscle cells derived from human varicose veins.** *Journal of vascular research* 2001, **38**(6):560-568.
101. Sansilvestri-Morel P, Rupin A, Jullien ND, Lembrez N, Mestries-Dubois P, Fabiani JN, Verbeuren TJ: **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.** *Journal of vascular research* 2005, **42**(5):388-398.
102. Morla AO, Mogford JE: **Control of smooth muscle cell proliferation and phenotype by integrin signaling through focal adhesion kinase.** *Biochem Biophys Res Commun* 2000, **272**(1):298-302.
103. Shi ZD, Ji XY, Berardi DE, Qazi H, Tarbell JM: **Interstitial flow induces MMP-1 expression and vascular SMC migration in collagen I gels via an ERK1/2-dependent and c-Jun-mediated mechanism.** *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2010, **298**(1):H127-135.
104. Xiao Y, Huang Z, Yin H, Lin Y, Wang S: **In vitro differences between smooth muscle cells derived from varicose veins and normal veins.** *Journal of vascular surgery* 2009, **50**(5):1149-1154.
105. Zhang H, Chalothorn D, Jackson LF, Lee DC, Faber JE: **Transactivation of epidermal growth factor receptor mediates catecholamine-induced growth of vascular smooth muscle.** *Circ Res* 2004, **95**(10):989-997.
106. Cui Y, Sun YW, Lin HS, Su WM, Fang Y, Zhao Y, Wei XQ, Qin YH, Kohama K, Gao Y: **Platelet-derived growth factor-BB induces matrix metalloproteinase-2 expression and rat vascular smooth muscle cell migration via ROCK and ERK/p38 MAPK pathways.** *Molecular and cellular biochemistry* 2014, **393**(1-2):255-263.
107. Raffetto JD, Barros YV, Wells AK, Khalil RA: **MMP-2 induced vein relaxation via inhibition of $[Ca^{2+}]_e$ -dependent mechanisms of venous smooth muscle contraction. Role of RGD peptides.** *The Journal of surgical research* 2010, **159**(2):755-764.

108. Chew DK, Conte MS, Khalil RA: **Matrix metalloproteinase-specific inhibition of Ca²⁺ entry mechanisms of vascular contraction.** *Journal of vascular surgery* 2004, **40**(5):1001-1010.
109. Waitkus-Edwards KR, Martinez-Lemus LA, Wu X, Trzeciakowski JP, Davis MJ, Davis GE, Meininger GA: **alpha(4)beta(1) Integrin activation of L-type calcium channels in vascular smooth muscle causes arteriole vasoconstriction.** *Circ Res* 2002, **90**(4):473-480.
110. Alberelli MA, De Candia E: **Functional role of protease activated receptors in vascular biology.** *Vascular pharmacology* 2014, **62**(2):72-81.
111. Feletou M: **Endothelium-Dependent Hyperpolarization and Endothelial Dysfunction.** *Journal of cardiovascular pharmacology* 2016, **67**(5):373-387.
112. Aravind B, Saunders B, Navin T, Sandison A, Monaco C, Paleolog EM, Davies AH: **Inhibitory effect of TIMP influences the morphology of varicose veins.** *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 2010, **40**(6):754-765.
113. Pereira Alves C, Costa Almeida CM, Pratas Balhau A: **Terapêutica compressiva nas doenças venosas dos membros inferiores:** Sociedade Portuguesa de Cirurgia - Capítulo de Ciurgia Vascular; 2009.
114. Couzan S, Leizorovicz A, Laporte S, Mismetti P, Pouget JF, Chapelle C, Quere I: **A randomized double-blind trial of upward progressive versus degressive compressive stockings in patients with moderate to severe chronic venous insufficiency.** *Journal of vascular surgery* 2012, **56**(5):1344-1350 e1341.
115. Nelson EA, Hillman A, Thomas K: **Intermittent pneumatic compression for treating venous leg ulcers.** *The Cochrane database of systematic reviews* 2014(5):CD001899.
116. Bush R, Comerota A, Meissner M, Raffetto JD, Hahn SR, Freeman K: **Recommendations for the medical management of chronic venous disease: The role of Micronized Purified Flavanoid Fraction (MPFF).** *Phlebology* 2017, **32**(1_suppl):3-19.
117. Cerbone AM, Tufano A, Coppola A, Cimino E, Di Minno MN, Di Minno G: **Pharmacological treatment and prevention of chronic venous ulcers: a review.** *Minerva cardioangiologica* 2015, **63**(3):231-238.

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador- β 1 na doença venosa crônica dos membros inferiores

118. Jull AB, Arroll B, Parag V, Waters J: **Pentoxifylline for treating venous leg ulcers.** *The Cochrane database of systematic reviews* 2012, **12**:CD001733.
119. Carradice D, Mekako AI, Mazari FA, Samuel N, Hatfield J, Chetter IC: **Randomized clinical trial of endovenous laser ablation compared with conventional surgery for great saphenous varicose veins.** *The British journal of surgery* 2011, **98**(4):501-510.
120. Costa Almeida CE: **Treatment of Perforating Veins - Review of Techniques.** *Revista Portuguesa de Cirurgia* 2014, **2**(31):27-33.
121. Dwerryhouse S, Davies B, Harradine K, Earnshaw JJ: **Stripping the long saphenous vein reduces the rate of reoperation for recurrent varicose veins: five-year results of a randomized trial.** *Journal of vascular surgery* 1999, **29**(4):589-592.
122. Bellmunt-Montoya S, Escribano JM, Dilme J, Martinez-Zapata MJ: **CHIVA method for the treatment of chronic venous insufficiency.** *The Cochrane database of systematic reviews* 2013(7):CD009648.
123. Pfaffl MW, Lange IG, Daxenberger A, Meyer HH: **Tissue-specific expression pattern of estrogen receptors (ER): quantification of ER alpha and ER beta mRNA with real-time RT-PCR.** *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 2001, **109**(5):345-355.
124. Virtanen M, Vahtera J, Singh-Manoux A, Elovainio M, Ferrie JE, Kivimaki M: **Unfavorable and favorable changes in modifiable risk factors and incidence of coronary heart disease: The Whitehall II cohort study.** *International journal of cardiology* 2018.
125. Vlajinac HD, Radak DJ, Marinkovic JM, Maksimovic MZ: **Risk factors for chronic venous disease.** *Phlebology* 2012, **27**(8):416-422.
126. Chang JW, Maeng YH, Kim SW: **Expression of matrix metalloproteinase-2 and -13 and tissue inhibitor of metalloproteinase-4 in varicose veins.** *The Korean journal of thoracic and cardiovascular surgery* 2011, **44**(6):387-391.
127. Nwomeh BC, Liang HX, Cohen IK, Yager DR: **MMP-8 is the predominant collagenase in healing wounds and nonhealing ulcers.** *The Journal of surgical research* 1999, **81**(2):189-195.
128. Xiao Q, Zhang F, Grassia G, Hu Y, Zhang Z, Xing Q, Yin X, Maddaluno M, Drung B, Schmidt B *et al*: **Matrix metalloproteinase-8 promotes vascular smooth muscle cell**

- proliferation and neointima formation.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014, **34**(1):90-98.
129. Kowalewski R, Sobolewski K, Wolanska M, Gacko M: **Matrix metalloproteinases in the vein wall.** *International angiology : a journal of the International Union of Angiology* 2004, **23**(2):164-169.
130. Kosugi I, Urayama H, Kasashima F, Ohtake H, Watanabe Y: **Matrix metalloproteinase-9 and urokinase-type plasminogen activator in varicose veins.** *Annals of vascular surgery* 2003, **17**(3):234-238.
131. Badier-Commander C, Verbeuren T, Lebard C, Michel JB, Jacob MP: **Increased TIMP/MMP ratio in varicose veins: a possible explanation for extracellular matrix accumulation.** *The Journal of pathology* 2000, **192**(1):105-112.
132. Sansilvestri-Morel P, Nonotte I, Fournet-Bourguignon MP, Rupin A, Fabiani JN, Verbeuren TJ, Vanhoutte PM: **Abnormal deposition of extracellular matrix proteins by cultured smooth muscle cells from human varicose veins.** *Journal of vascular research* 1998, **35**(2):115-123.
133. Kowalewski R, Malkowski A, Gacko M, Sobolewski K: **Influence of thrombophlebitis on TGF-beta1 and its signaling pathway in the vein wall.** *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society* 2010, **48**(4):542-548.
134. Badier-Commander C, Couvelard A, Henin D, Verbeuren T, Michel JB, Jacob MP: **Smooth muscle cell modulation and cytokine overproduction in varicose veins. An in situ study.** *The Journal of pathology* 2001, **193**(3):398-407.
135. Labropoulos N, Kang SS, Mansour MA, Giannoukas AD, Buckman J, Baker WH: **Primary superficial vein reflux with competent saphenous trunk.** *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 1999, **18**(3):201-206.
136. Abu-Own A, Scurr JH, Coleridge Smith PD: **Saphenous vein reflux without incompetence at the saphenofemoral junction.** *The British journal of surgery* 1994, **81**(10):1452-1454.
137. Cooper DG, Hillman-Cooper CS, Barker SG, Hollingsworth SJ: **Primary varicose veins: the sapheno-femoral junction, distribution of varicosities and patterns of incompetence.** *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 2003, **25**(1):53-59.

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador- β 1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

138. Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, Cohen R, Cros J, Faivre S, Raymond E, de Gramont A: **Targeting the TGF β pathway for cancer therapy.** *Pharmacology & therapeutics* 2015, **147**:22-31.
139. Mulay SR, Gaikwad AB, Tikoo K: **Combination of aspirin with telmisartan suppresses the augmented TGF β /smad signaling during the development of streptozotocin-induced type I diabetic nephropathy.** *Chemico-biological interactions* 2010, **185**(2):137-142.

As metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o fator de crescimento transformador-B1 na doença venosa crónica dos membros inferiores

8 Anexos

Anexo I. Questionário de escolha múltipla e resposta breve

Historia clínica doença venosa crónica dos membros inferiores

Vinheta do doente

CEAP

Classificação clínica		Classificação etiológica		Classificação anatómica	
C0	Sem sinais visíveis ou palpáveis de doença venosa	Ec	congénito	1	Telangiectasias
C1	Telangiectasias	Ep	primário	2	Veia grande safena acima do joelho
C2	Veias varicosas	Es	secundário	3	Veia grande safena abaixo do joelho
C3	Edema sem alteração da pele	Classificação fisiopatológica		4	Veia pequena safena
C4a	Pigmentação cutânea ou eczema	Pr	Refluxo	5	Doença sem relação com as veias safenas
C4b	Lipodermatoesclerose ou atrofia cutânea branca	Po	Obstrução	...	
C5	Úlcera venosa curada	Pr,o	Refluxo + Obstrução	17	Veias perfurantes ao nível da coxa
C6	Úlcera venosa activa	Pn	Desconhecida	18	Veias perfurantes ao nível da perna
S	Sintomático				
A	assintomático				

Sintomatologia

	Pernas pesadas	
	Dor	
	Edema	
	Prurido	
	Cãimbras	
	Pernas inquietas	
	Outra	Qual?

Factores que influenciam os sintomas

Piora	
	Fim do dia
	Período pré-menstrual
	Calor (verão)
Melhora	
	Durante a noite (deitado)
	Com o andar
	Compressão elástica
	Elevação das pernas
	Frio (Inverno)

Tratamentos anteriores

				Quando?
	Venotónicos		Flavonoides micronizados purificados	
			Outro	Qual?
	Compressão elástica			
	Escleroterapia			
	Cirurgia			
	Outro		Qual?	

Anexo II. Parecer da Comissão de Ética do Centro Hospitalar Cova da Beira

PARECER N.º 28/2009

COMISSÃO DE ÉTICA DO CENTRO HOSPITALAR COVA DA BEIRA

Na sua reunião de 19 e 26 de Fevereiro de 2009, esta Comissão de Ética apreciou o pedido de autorização do Dr. Pedro Miguel Azevedo Serralheiro, médico interno da especialidade de cirurgia geral no CHCB e aluno do Doutoramento em Medicina na Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, para a realização de um estudo subordinado ao tema “A clínica, as metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o factor de crescimento transformador B1 na insuficiência venosa crónica dos membros inferiores”, a realizar no Serviço de Cirurgia deste Centro Hospitalar.

Apreciado o projecto, concluiu esta Comissão de Ética nada ter a opor à realização do mesmo.

Covilhã, 19 e 26 de Fevereiro de 2009

O Presidente da Comissão de Ética



(Dr. Neves da Gama)

Anexo III. Documento entregue aos participantes no estudo no Centro Hospitalar da Cova da Beira.

Consentimento Livre e Informado

O Serviço de Cirurgia Geral do Centro Hospitalar da Cova da Beira, com a colaboração do Serviço de Cirurgia Cardiorácica do Hospital da Universidade de Coimbra, está correntemente a realizar um Estudo de Investigação com o objetivo de contribuir ativamente para a comunidade científica no conhecimento mais aprofundado na área da fisiopatologia da Insuficiência venosa dos membros inferiores, dando a possibilidade de desenvolvimentos futuros de novas formas de tratamento desta patologia. Para isso serão necessários recolher dados clínicos e imagiológicos dos doentes com Insuficiência Venosa dos Membros Inferiores, ou com patologia coronária e colher amostras de Veia Grande Safena que irão ser excisadas no tratamento cirúrgico a que o doente irá ser sujeito.

O Serviço de Cirurgia do Centro Hospitalar da Cova da Beira, vem solicitar a sua colaboração para que sejam utilizados os dados clínicos e imagiológicos, decorrentes da avaliação da patologia que apresenta e para que sejam utilizadas algumas amostras do tecido venoso, que irá ser sujeito a excisão durante a intervenção cirúrgica a que vai ser sujeito/a. Informa-se que a sua participação é voluntária, podendo desistir a qualquer momento, sem que por isso venha a ser prejudicado nos cuidados de saúde prestados pelo C.H.C.B., E.P.E.; informa-se ainda que todos os dados recolhidos são confidenciais.

Ao assinar esta página está a confirmar o seguinte:

- Entregou esta informação
- Explicou o propósito deste trabalho
- Explicou e respondeu a todas as questões e dúvidas apresentadas pelo doente.

Nome do investigador

Assinatura do investigador

Data

___/___/___

Ao assinar esta página está a confirmar o seguinte:

- O Sr.(a) leu e compreendeu todas as informações desta informação e teve tempo para as ponderar
- Todas as suas questões foram respondidas satisfatoriamente
- Se não percebeu qualquer das palavras, solicitou ao investigador que lhe fosse explicado, tendo este explicado todas as dúvidas.
- O Sr. (a) recebeu uma cópia desta informação, para a manter consigo.

Nome do Doente

Assinatura do Doente

Representante Legal

Data

___/___/___

Anexo IV. Documento entregue aos participantes no estudo no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra.

Consentimento Livre e Informado

O Serviço de Cirurgia Geral do Centro Hospitalar da Cova da Beira, com a colaboração do Serviço de Cirurgia Cardiorácica do Hospital da Universidade de Coimbra, está correntemente a realizar um Estudo de Investigação com o objetivo de contribuir ativamente para a comunidade científica no conhecimento mais aprofundado na área da fisiopatologia da Insuficiência venosa dos membros inferiores, dando a possibilidade de desenvolvimentos futuros de novas formas de tratamento desta patologia. Para isso serão necessários recolher dados clínicos e imagiológicos dos doentes com patologia coronária e colher amostras de Veia Grande Safena, que irão ser excisadas no tratamento cirúrgico a que o doente irá ser sujeito e servirão de grupo controlo no referido estudo.

O Serviço de Cirurgia do Centro Hospitalar da Cova da Beira, vem solicitar a sua colaboração para que sejam utilizados os dados clínicos e imagiológicos, decorrentes da avaliação da patologia que apresenta e para que seja utilizada uma amostra de 2 cm do tecido venoso que irá ser necessariamente excisado durante a intervenção cirúrgica a que vai ser sujeito/a, para a realização do *bypass* coronário.

As amostras irão ser utilizadas para o estudo em laboratório de metaloproteinases, (enzimas da parede venosa) e TGF- β 1 (uma citocina também presente na parede venosa). As amostras serão acondicionadas na Faculdade de Medicina da Universidade da Beira Interior e irão ser incineradas posteriormente ao estudo. Não se acarretam quaisquer riscos ou benefícios diretos para si na recolha das referidas amostras.

Informa-se que a sua participação é voluntária, podendo desistir a qualquer momento, sem que por isso venha a ser prejudicado nos cuidados de saúde prestados pelo H.U.C., E.P.E.; informa-se ainda que todos os dados recolhidos são confidenciais, sujeitos a código identificador a que só o investigador responsável terá acesso.

Ao assinar esta página está a confirmar o seguinte:

- Entregou esta informação
- Explicou o propósito deste trabalho
- Explicou e respondeu a todas as questões e dúvidas apresentadas pelo doente.

Nome do investigador

Assinatura do investigador

Data

___/___/___

Ao assinar esta página está a confirmar o seguinte:

- O Sr.(a) leu e compreendeu todas as informações desta informação e teve tempo para as ponderar
- Todas as suas questões foram respondidas satisfatoriamente
- Se não percebeu qualquer das palavras, solicitou ao investigador que lhe fosse explicado, tendo este explicado todas as dúvidas.
- O Sr.(a) recebeu uma cópia desta informação, para a manter consigo.

Nome do Doente

Assinatura do Doente

Representante Legal

Data

___/___/___