

El gen del factor de transcripción-1 de unión a octámero muestra una expresión aumentada en las venas varicosas primarias

Gui-Ae Jeong¹, Eric T. Cho² y Jeong-Hwan Chang^{1,2}, Gwangju, Corea del Sur, y St. Louis, Missouri, Estados Unidos

Aunque se asume que la patogenia de las venas varicosas es multifactorial, incluyendo el proceso de envejecimiento, la etiología de este problema —especialmente en las personas muy jóvenes— está fuertemente relacionada con factores genéticos y se supone se debe a un desarrollo y regulación inapropiados de la maduración del tejido venoso. El objetivo de este estudio ha sido la identificación de los genes cuya expresión es diferente en las venas varicosas primarias, en comparación con las venas normales de las piernas. Para evaluar esta hipótesis, se aplicó la técnica de expresión diferencial de genes en un análisis a gran escala del ARN mensajero procedente de venas varicosas y de venas normales. Los productos de la transcripción correspondientes al ADN complementario fueron comparados entre ambos tipos de venas y en todos los grupos de experimentos se observó un gen que presentaba la mayor expresión diferencial, lo que fue confirmado mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa. El gen del factor de transcripción-1 de unión a octámero (*Oct-1*) apareció expresado de manera aumentada en las venas varicosas primarias. Por tanto, nuestra propuesta es la de que el gen *Oct-1* puede desempeñar una función importante en el desarrollo de las venas varicosas primarias de la extremidad inferior.

INTRODUCCIÓN

A pesar de que se han propuesto diversas teorías acerca de la patogenia de las venas varicosas primarias en la extremidad inferior, el punto de vista más aceptado es el de que la etiología de este problema es multifactorial, incluyendo la incompetencia valvular y el proceso de envejecimiento. Recientemente,

varios investigadores han señalado que la causa primaria de las venas varicosas, especialmente en las personas muy jóvenes, es la debilidad de la pared vascular secundaria a la disfunción del músculo liso y al metabolismo inapropiado del tejido conjuntivo^{1,2}. Así, la incompetencia valvular puede ser la secuela y no la causa primaria de las varicosidades. Por otra parte, Gandhi et al³ analizaron venas varicosas potenciales que correspondían a segmentos competentes de vena safena interna (VSI) afectados por varicosidades en localizaciones alternadas. Estos investigadores descubrieron que el perfil bioquímico de las venas varicosas potenciales era similar al de las venas varicosas, y propusieron la existencia de alteraciones en el tejido conjuntivo previas al desarrollo de la incompetencia valvular.

A consecuencia de ello, la estrategia aplicada para el conocimiento de la patogenia de las venas varicosas ha evolucionado desde el estudio de las

DOI of original article: 10.1016/j.avsg.2007.08.003.

¹Department of Surgery and Medical Research Institute, College of Medicine, Chosun University, Gwangju, Corea del Sur.

²Department of Surgery, Washington University, St. Louis, MO, EE.UU.

Correspondencia: Jeong-Hwan Chang, 588 Seo-suk Dung, Donggu, Gwangju, Corea del Sur, 501-717. Correo electrónico: jchang@chosun.ac.kr

Ann Vasc Surg 2008; 22: 115-120

DOI: 10.1016/j.avsp.2008.04.021

© Annals of Vascular Surgery Inc.

Publicado en la red: enero 12, 2008

Tabla I. Características de los pacientes según la clasificación CEAP

CEAP	Pacientes, n (%)
Estadio clínico	
C2/C3	19 (95%)
C4	1 (5%)
Etiología	
Primaria	20 (100%)
Anatomía	
Vena superficial 2	3 (15%)
Vena superficial 3	11 (55%)
Vena superficial 4	6 (30%)
Patología	
Reflujo	20 (100%)

CEAP: clínica, etiología, anatomía y fisiopatología.

alteraciones anatómicas o estructurales hasta la biología molecular y la genética⁴⁻⁶. Específicamente, se han introducido técnicas para identificar los genes de expresión diferencial (DEG, *differentially expressed genes*) en las células y tejidos, con objeto de mejorar la metodología para la comparación y la verificación de los ARN mensajeros (ARNm) expresados en los estados patológicos y en las situaciones normales. En este estudio hemos utilizado la tecnología de amplificación selectiva de miembros familiares (SAFM, *selective amplification of family members*) para identificar los DEG en venas varicosas primarias y en venas normales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Tras la aprobación por parte del comité de estudios humanos de la Chosun University (Gwangju, Corea del Sur), se obtuvieron 20 muestras de venas varicosas correspondientes a pacientes (14 hombres, seis mujeres) intervenidos mediante flebectomía de venas varicosas. Antes de las intervenciones se llevó a cabo un eco-Doppler venoso de las extremidades inferiores en los 20 pacientes y en todos ellos se confirmó la presencia de incompetencia valvular y de reflujo. No se detectaron casos de trombosis venosa profunda ni de alteraciones en las venas perforantes. La tabla I muestra las características de los pacientes según la clasificación clínica, etiología, anatomía y fisiopatología (CEAP, *clinical, etiological, anatomical, and pathophysiological*). También se obtuvieron siete muestras de VSI normal en dos grupos: 1) intervenciones de amputación por traumatismo ($n = 5$ pacientes) y 2) derivación infrainguinal por patología oclusiva arterial periférica ($n = 2$

pacientes). Los pacientes del grupo control no presentaban ningún trastorno venoso conocido, tal como insuficiencia venosa crónica o trombosis venosa profunda. Además, se llevó a cabo un eco-Doppler para identificar la presencia de reflujo antes de la cirugía. Después de la obtención de los especímenes venosos, se congelaron a -70°C muestras de las venas en fresco, hasta la realización del estudio. En el conjunto de 20 muestras de venas varicosas y de siete especímenes de venas normales se seleccionaron aleatoriamente cinco de venas varicosas y tres de venas normales (dos pacientes con derivación infrainguinal y un paciente con un traumatismo) para la aplicación de la tecnología SAFM con el objetivo de identificar los DEG y de realizar un análisis de inmunotransferencia Western.

Síntesis de la primera cadena del ADN complementario

Se realizó la extracción del ARN total de las muestras venosas para la síntesis del ADN complementario (ADNc) de primera cadena mediante transcripción inversa (RT, *reverse transcriptase*; Invitrogen, Carlsbad, CA). La transcripción inversa se llevó a cabo durante 90 min a 42°C en un volumen total de la reacción final de 20 μl que contenía 3 μg del ARN total purificado, 4 μl de tampón de reacción $\times 5$ (Promega, Madison, WI), 5 μl de trifosfatos desoxinucleótidos (cada uno de ellos, 2 mM), 2 μl de 10 μM 50-CGTGAATGCTGCGACTACGATII IIT[18]-3', 0,5 μl de inhibidor RNasin (40 U/ μl , Promega) y 1 μl de transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (200 U/ μl , Promega). La primera cadena del ADNc fue diluida mediante la adición de 180 μl de agua ultrapurificada para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*) de la SAFM, con almacenamiento a -20°C hasta su uso.

PCR SAFM basada en el método del primer de control de la hibridación (ACP, *annealing control primer*)

Los genes de los factores de transcripción con expresión diferencial, especialmente los genes homeosecuencia ("homeobox"), fueron evaluados mediante el Sistema de aislamiento del factor de transcripción SAFM (*Transcription Factor Isolation System*; Seegene USA, Rockville, MD). La PCR SAFM se llevó a cabo mediante dos series de amplificación PCR según las instrucciones del fabricante. La primera serie de PCR se realizó a 50°C durante un ciclo de PCR de primera fase en un volumen total de reacción final de 50 μl que

contenía 1-3 μ l (aproximadamente, 50 ng) de la primera cadena del ADNc diluido, 1 μ l de dT-ACP2 (10 μ M), 1 μ l de 10 μ M First SAFM ACP y 25 μ l de 2 \times Master Mix (Seegene). El protocolo PCR para la síntesis de la segunda cadena fue un ciclo a 94 °C durante 1 min, seguido de otro ciclo a 50 °C durante 3 min y de un ciclo final a 72 °C durante 1 min. Tras la finalización de la síntesis de la segunda cadena del ADN, el protocolo de amplificación PCR de segunda fase consistió en un total de 25 ciclos a 94 °C durante 40 s seguido de ciclos a 65 °C durante 40 s y a 72 °C durante 40 s, seguidos en última instancia por un ciclo final ampliado de 5 min a 72 °C. La segunda serie de la PCR se efectuó en un volumen total de reacción final de 50 μ l que contenía 1-3 μ l de los productos de la primera PCR, 1 μ l de dT-ACP2 (10 μ M), 1 μ l de Second SAFM ACP y 25 μ l de 2 \times Master Mix. En lo relativo a las condiciones de la PCR, tras un inicio en caliente durante 5 min a 94 °C se realizaron 40 ciclos de 40 s a 94 °C, seguidos de ciclos a 65 °C durante 40 s y a 72 °C durante 40 s, y —finalmente— de un ciclo ampliado final de 5 min a 72 °C. Los productos de la PCR amplificada fueron separados en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

Clonación y secuenciación

Las bandas de expresión diferencial fueron extraídas del gel mediante el GENCLEAN II Kit (Q-BIO Gene, Carlsbad, CA) y clonadas directamente en un vector de clonación TOPO TA (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. Los plásmidos clonados fueron secuenciados con el ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Confirmación RT-PCR

La expresión diferencial de los DEG fue confirmada mediante RT-PCR utilizando cada par de *primers* con especificidad genética. El ADNc de primera cadena fue normalizado con el gen de la actina β . El ADNc normalizado se utilizó como plantilla. Después, usamos el *primer* de sentido, 50-TCCACAGAGC CAGTCAACACC-30, y un *primer* antisentido, 50-TTTCTTTCTGGCGGCGTTAC-30, para los DEG de la segunda cadena (DEG-s2).

La PCR se llevó a cabo en un volumen total de reacción final de 20 μ l que contenían 2-4 μ l (aproximadamente, 50 ng) de ADNc de la primera cadena diluido, 1 μ l de *primer* 5 (10 μ M) y 10 μ l de 2 \times Master Mix. El protocolo de amplificación PCR consistió en una desnaturalización inicial de 3 min

a 94 °C, seguida de 20-25 ciclos a 94 °C durante 40 s, a 60 °C durante 40 s y a 72 °C durante 40 s, seguido en último lugar de un ciclo extendido final de 5 min a 72 °C. Los productos de la PCR amplificada fueron separados en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Los geles fueron evaluados mediante una cámara digital Kodak DC 290 (Eastman Kodak, Rochester, NY) y se llevó a cabo una cuantificación densitométrica mediante el programa de análisis de imagen UN-SCAN-IT (Silk Scientific, Orem, UT).

Análisis de inmunotransferencia Western

Las muestras de las venas congeladas fueron descongeladas y homogeneizadas con un tampón de lisis celular (BD Biosciences, San Diego, CA) y se determinaron sus concentraciones proteicas mediante un kit de análisis de proteínas (técnica del ácido bicínico; Pierce, Rockford, IL). Las proteínas (50 μ g) fueron separadas mediante electroforesis en gel de sulfato-poliacrilamida sódica al 10% y transferidas a lo largo de la noche a una membrana de difluoruro de polivinilideno (Gelman Laboratory, Ann Arbor, MI). Las membranas fueron bloqueadas durante 1 h a temperatura ambiente en tampón salino Tween-20 Tris (TBS-T) que contenía un 0,5% (peso/volumen) de leche en polvo desnatada (GIBCO BRL, Grand Island, NY) e incubadas con un anticuerpo anti-Oct-1 (1:1,000; BioVison Inc., Mountain View, CA) durante 2 h a temperatura ambiente. Las membranas fueron lavadas tres veces con TBS-T e incubadas con anticuerpos IgG antirratón conjugados con peroxidasa de rábano (HRP, *horseradish peroxidase*) (1:1,000; Jackson ImmunoResearch, Baltimore, PA) durante 1 h a temperatura ambiente. Tras la incubación, las membranas fueron lavadas tres veces con TBS-T. La actividad de la HRP fue evaluada a través del patrón de expresión de la proteína utilizando un sustrato de quimioluminiscencia. Se realizaron cuantificaciones densitométricas con el programa de análisis de imagen UN-SCAN-IT.

Análisis estadístico

Todos los procedimientos experimentales se realizaron al menos tres veces y los datos fueron analizados mediante el método de la media \pm error estándar de la media. Para las comparaciones estadísticas se utilizó la prueba *t* de Student. Se consideraron significativos los valores $p < 0,05$.

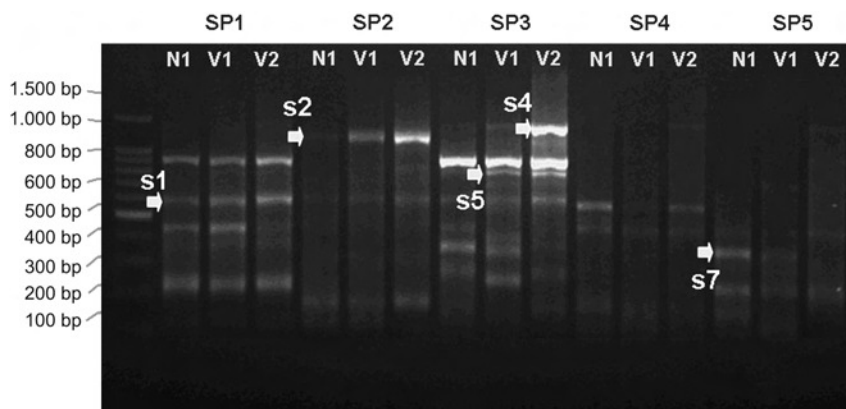


Fig. 1. Cinco bandas de ADNc (DEG-s1, -s2, -s4, -s5, -s7) con expresión diferencial de genes del factor de transcripción, especialmente genes homeosecuencia ("homeobox"), detectados mediante el Sistema de aislamiento de factores de transcripción SAFM.

RESULTADOS

Identificación de los DEG en venas varicosas y normales mediante tecnología SAFM

Inicialmente, se extrajo el ARN total de las VSI de dos pacientes con venas varicosas en las extremidades inferiores (pacientes V1 y V2) y en un paciente con venas normales (paciente con traumatismo N1), y este ARN se utilizó para la síntesis de la primera cadena del ADNc. Entre las venas varicosas y las venas normales, observamos varias bandas de ADNc que presentaban diferencias cuando se expresaban. Las diferencias en los niveles de expresión en las venas varicosas fueron mayores o menores que en la vena normal.

Entre estas bandas de ADNc, seleccionamos cinco (s1, -s2, -s4, -s5, -s7) que correspondían a genes del factor de transcripción con expresión diferencial, especialmente genes homeosecuencia ("homeobox"), detectados mediante el Sistema de aislamiento de factores de transcripción SAFM (*Transcription Factor Isolation System*); después, realizamos la extracción de estas bandas del gel para su clonación y secuenciación. Tras la secuenciación de las bandas de ADNc, efectuamos una búsqueda en GeneBank para identificar los ADNc con expresión diferencial respecto a la secuencia registrada de ADN.

En el conjunto de DEG correspondientes a las venas varicosas y las venas normales, nos centramos en un gen (DEG-s2) que presentaba la expresión mayor (este gen fue identificado como el factor de transcripción-1 octámero, *Oct-1*) en las venas varicosas, en comparación con las normales (fig. 1).

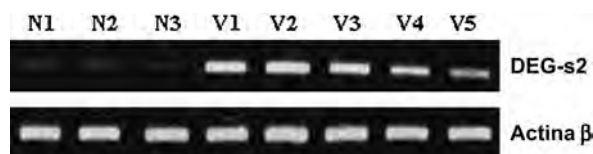


Fig. 2. Electroforesis en gel de agarosa al 2% con los productos RT-PCR amplificados; se puede observar que la expresión del gen *Oct-1* es mayor en las venas varicosas que en las venas normales. DEG: genes de expresión diferencial.

Resultados de la RT-PCR

Para confirmar la expresión diferencial del gen DEG-s2 (gen *Oct-1*), realizamos la RT-PCR sobre las muestras iniciales de venas (V1, V2 y N1) y sobre muestras venosas adicionales de tres venas varicosas (V3, V4 y V5) además de dos venas normales adicionales (N2 y N3, en ambos casos correspondientes a pacientes con derivación infrainguinal). Tras la RT-PCR, llevamos a cabo la electroforesis en gel de agarosa al 2% con los productos RT-PCR amplificados y el resultado demostró que la expresión del gen *Oct-1* era mayor en las venas varicosas que en las normales (fig. 2). No se observaron diferencias en la expresión del gen *Oct-1* entre la vena normal de un paciente con traumatismo y las venas normales de los pacientes con derivación infrainguinal.

Inmunotransferencia Western

Se realizó la inmunotransferencia Western para determinar si existía un incremento en la expresión de la proteína Oct-1 en las venas varicosas. En primer lugar, realizamos la RT-PCR

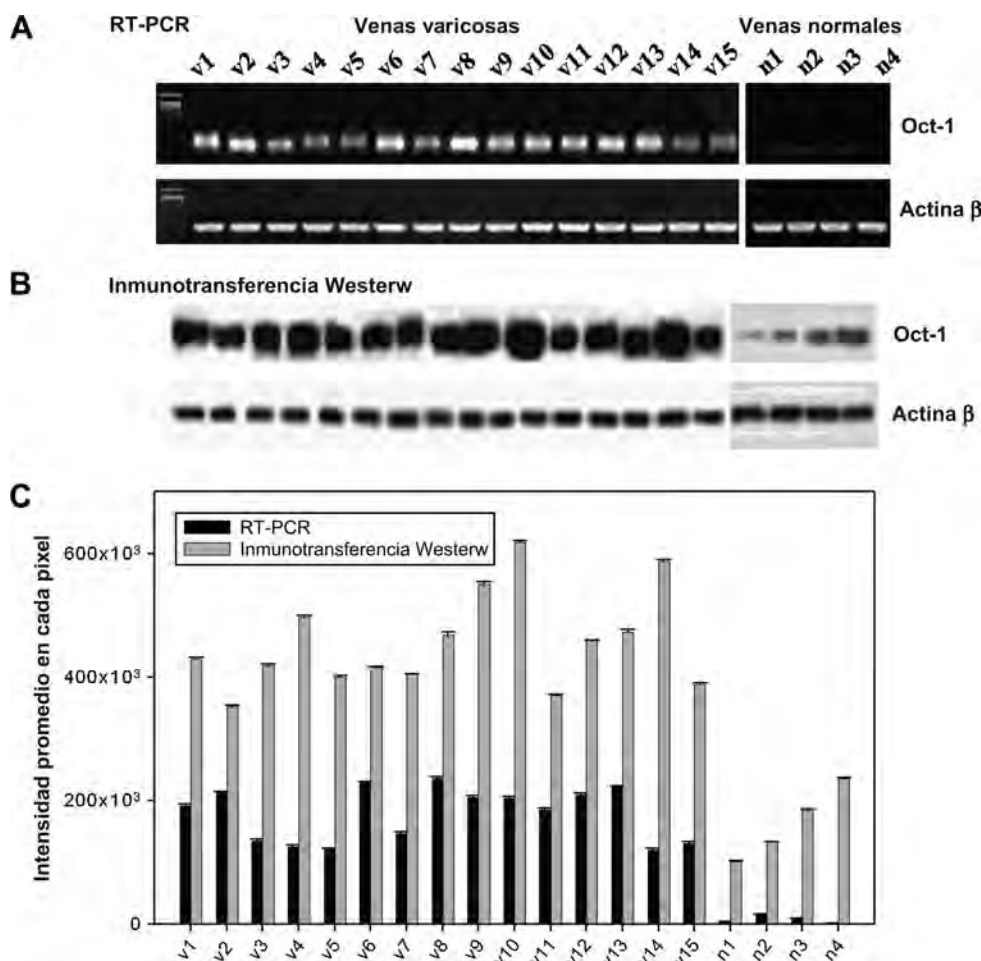


Fig. 3. RT-PCR realizada sobre muestras adicionales de venas (cuatro venas normales [todas ellas procedentes de pacientes con traumatismo] y 15 venas varicosas) para identificar el nivel del ARNm de *Oct-1* (A). La RT-PCR demostró que el nivel del ARNm del gen *Oct-1* fue mayor en las venas varicosas que en las venas normales (C, $p < 0,001$). De la misma manera, la inmunotransferencia Western sobre las mismas muestras demostró que la expresión de la proteína Oct-1 fue mayor en las venas varicosas (B, C). RT-PCR: transcripción inversa- reacción en cadena de la polimerasa.

sobre muestras venosas adicionales (cuatro venas normales [todas ellas procedentes de pacientes con traumatismo] y 15 venas varicosas) para identificar el nivel de ARNm de la proteína Oct-1 (fig. 3A). El resultado de la RT-PCR demostró que el nivel de ARNm del gen *Oct-1* era mayor en las venas varicosas que en las venas normales (fig. 3C, $p < 0,001$), de la misma manera que había ocurrido con el gen. Así mismo, el resultado de la inmunotransferencia Western con las mismas muestras demostró que la expresión de la proteínas Oct-1 era mayor en las venas varicosas (fig. 3B y 3C; $p < 0,001$).

DISCUSIÓN

La aparición de venas varicosas primarias en las extremidades inferiores constituye una

manifestación frecuente de la insuficiencia venosa crónica, cuya naturaleza recurrente puede dar lugar a una discapacidad crónica. Sin embargo, el concepto de que las venas varicosas se debe principalmente a incompetencia valvular está siendo puesto en duda; así, se han publicado numerosos estudios en los que se ha señalado que la etiología de este problema es una alteración en el desarrollo de la pared venosa¹⁻³. En estos estudios se ha sugerido que las dilataciones de las venas pueden aparecer debido a que la pared venosa está estructuralmente “debilitada”, de manera que la incompetencia valvular es un fenómeno secundario.

Los avances recientes en las técnicas de biología molecular han ofrecido una oportunidad para analizar con rapidez un elevado número de genes biológicamente significativos. Nuestro grupo ha

identificado diversos DEG para comparar y verificar la expresión de su ARNm en las venas normales y en las venas varicosas primarias, lo que nos ha permitido determinar la patogenia de las venas varicosas. En este estudio se han identificado varios ARNm que presentaron una expresión diferencial en las venas normales y las venas varicosas. Finalmente, nos centramos en un solo gen, *Oct-1*, que es el que presenta una expresión más intensa en las venas varicosas primarias, en comparación con las venas normales.

Oct-1 es una proteína nuclear ubicua que se expresa en todas las células eucariotas y que forma parte de la familia con homeosecuencia ("homeobox") POU (Pit-1, *Oct-1*, unc-86). Está implicada en la regulación transcripcional de la expresión genética relacionada con el ciclo celular y el desarrollo, y desempeña funciones múltiples en la célula, actuando a través de una regulación positiva o negativa de la transcripción génica⁷. La proteína *Oct-1* se une a la secuencia octámero específica ATGCAAAT y esta parte octámero es reconocida por una familia de factores de transcripción que contienen un dominio de al ADN conservado con un dominio específico relacionado con la homeosecuencia ("homeobox") (es decir, el dominio POU)⁸. Por tanto, la proteína *Oct-1* activa los promotores génicos que contienen dicha secuencia octámero y que son genes expresados de manera ubicua y con especificidad tisular, tal como el gen de la histona H2B^{9,10}.

Recientemente, se ha demostrado que el factor homeosecuencia ("homeobox") de la familia POU (es decir, la proteína *Oct-1* expresada de manera ubicua) da lugar a la transactivación del promotor ciclina D1 en un complejo con transductores de señal y activadores de la transcripción¹¹ (STAT, *signal transducers and activators of transcription*). STAT5 es un factor de transcripción citoplásmico latente que fue descubierto como un mediador de la respuesta celular frente a los interferones y a las citocinas. Magne et al¹¹ demostraron que STAT5 activa la transcripción del promotor ciclina D1 mediante su asociación a *Oct-1* a través de su dominio POU. Este hecho indica que STAT está relacionado con *Oct-1* y que forma un complejo *Oct-1*/STAT5 funcional en el promotor ciclina D1. Ciclina D1 es un protooncogén regulador del ciclo celular de los mamíferos, que actúa en el punto de restricción en la parte final de la fase G₁ y que es esencial para la progresión del ciclo celular a partir de dicho punto. También se ha demostrado que está expresado de manera aumentada en numerosos tipos celulares diferenciados y no proliferativos, así como durante la apoptosis^{12,13}.

Ascher et al^{6,14} estudiaron la posibilidad de que la apoptosis y el ciclo celular presentaran características distintas en las venas varicosas que en las venas normales. Observaron que en las venas varicosas estaba inhibida la apoptosis e incrementada la expresión nuclear de ciclina D1. Sus resultados demostraron que las células adventiciales de las venas varicosas mostraban una supervivencia mayor y adquirirían características disfuncionales. Estos investigadores propusieron la posibilidad de que el incremento en la supervivencia de las células adventiciales podría dar lugar a la aparición de células disfuncionales, y que estas células podrían ser las causantes de la debilidad o la dilatación de la pared venosa. Además, insistieron en la posibilidad de que el incremento en la expresión de ciclina D1 en los núcleos de las células de la capa media de las venas varicosas podría indicar que la desregulación del ciclo celular desempeña una función importante en la etiología de las venas varicosas. Según los datos presentados en este estudio, nuestro grupo considera que el gen *Oct-1* tiene una cierta relación con las venas varicosas a través de la vía ciclina D1 o de alguna otra vía que todavía es desconocida.

En este estudio se ha aplicado la novedosa tecnología SAFM para determinar la posible existencia de una diferencia genética entre las venas varicosas y las venas normales. Así, observamos que el gen *Oct-1* presenta una expresión aumentada en las venas varicosas, en comparación con las venas normales. Además, demostramos que la expresión de *Oct-1* fue mayor en las venas varicosas que en las venas normales, también a nivel de la proteína. Teniendo en cuenta los efectos pleótipos del gen *Oct-1* sobre diversos genes reguladores, tal como la ciclina D1, nuestra sugerencia es la de que el gen *Oct-1* puede desempeñar un papel importante en el desarrollo y la maduración de las venas varicosas primarias. Por supuesto, son necesarios nuevos estudios para determinar los mecanismos precisos que implican al gen *Oct-1* en la patogenia de las venas varicosas primarias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rose SS, Ahmed A. Some thoughts on the aetiology of varicose veins. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 1986;27:534-543.
2. Clarke GH, Vasdekis SN, Hobbs JT, et al. Venous wall function in the pathogenesis of varicose veins. *Surgery* 1992;111:402-408.
3. Gandhi RH, Irizarry E, Nackman GB, et al. Analysis of the connective tissue matrix and proteolytic activity of primary varicose veins. *J Vasc Surg* 1993;18:814-820.
4. Cornu-Thenard A, Boivin P, Baud JM, De Vincenzi I, Carpentier PH. Importance of the familial factor in varicose

- disease. Clinical study of 134 families. *J Dermatol Surg Oncol* 1994;20:318-326.
5. 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.
 6. Ascher E, Jacob T, Hingorani A, et al. Programmed cell death (apoptosis) and its role in the pathogenesis of lower extremity varicose veins. *Ann Vasc Surg* 2000;14:24-30.
 7. Verrijzer CP, Strating M, Mul YM, et al. POU domain transcription factors from different subclasses stimulate adenovirus DNA replication. *Nucleic Acids Res* 1992;20: 6369-6375.
 8. Sturm RA, Das G, Herr W. The ubiquitous octamer-binding protein Oct-1 contains a POU domain with a homeo box subdomain. *Genes Dev* 1988;2:1582-1599.
 9. Fletcher C, Heintz N, Roeder RG. Purification and characterization of OTF-1, a transcription factor regulating cell cycle expression of a human histone H2b gene. *Cell* 1987;51:773-781.
 10. Murphy S, Yoon JB, Gerster T, et al. Oct-1 and Oct-2 potentiate functional interactions of a transcription factor with the proximal sequence element of small nuclear RNA genes. *Mol Cell Biol* 1992;12:3247-3261.
 11. Magne S, Caron S, Charon M, et al. STAT5 and Oct-1 form a stable complex that modulates cyclin D1 expression. *Mol Cell Biol* 2003;23:8934-8945.
 12. Burger C, Wick M, Muller R. Lineage-specific regulation of cell cycle gene expression in differentiating myeloid cells. *J Cell Sci* 1994;107:2047-2054.
 13. Horiguchi-Yamada J, Yamada H, Nakada S, et al. Changes of G₁ cyclins, cdk2, and cyclin A during the differentiation of HL60 cells induced by TPA. *Mol Cell Biochem* 1994;132:31-37.
 14. Ascher E, Jacob T, Hingorani A, et al. Expression of molecular mediators of apoptosis and their role in the pathogenesis of lower-extremity varicose veins. *J Vasc Surg* 2001;33:1080-1086.